

华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

鲟形目部分种类基于线粒体 CO I 基因的分子进化研究
MOLECULAR EVOLUTION
OF PARTIAL ACIPENSERIFORMES SPECIES INFERRED
FROM MITOCHONDRIAL CO I GENE

研究生：胡佳

CANDIDATE: HU JIA

导师：危起伟 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR WEI QIWEI

专业：湿地资源与环境

**MAJOR: WETLAND RESOURCE AND
ENVIRONMENT**

研究方向：鱼类分子进化

**FIELD: MOLECULAR EVOLUTION OF
FISHES**

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇一〇年六月
JUNE, 2010

分类号

密级

华中农业大学硕士学位论文

鲟形目部分种类基于线粒体 CO I 基因的分子进化研究

Molecular evolution of partial Acipenseriformes species inferred from mitochondrial CO I gene

研 究 生：胡 佳

指 导 教 师：危起伟 教授

指 导 小 组：危起伟 教授

汪登强 副研究员

沈 丽 助理研究员

专业：湿地资源与环境

研究方向：鱼类分子进化

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2010 年 6 月

华中农业大学水产学院

二〇一〇年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明			
<p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
研究生签名: 胡佳		时间: 2010 年 5 月 15 日	
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p>注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。</p>			
学位论文作者签名: 胡佳		导师签名: 	
签名日期: 2010年 5 月 15 日		签名日期: 2010年 5 月 15 日	

目 录

摘 要.....	1
ABSTRACT.....	2
第一章 文献综述.....	4
1.1 分子进化与分子钟研究.....	4
1.1.1 分子进化的中性学说.....	4
1.1.2 中性检验.....	5
1.1.3 蛋白质的适应性进化.....	5
1.1.4 分子钟假说.....	7
1.1.5 分子钟检验.....	8
1.2 分子系统发育.....	8
1.2.1 核苷酸序列替代模型.....	9
1.2.2 系统发育重建.....	10
1.2.3 系统发育方法评价.....	12
1.2.4 系统发育分析软件.....	13
1.3 鲟形目鱼类分类地位和资源现状.....	14
1.3.1 分类地位.....	14
1.3.2 资源状况.....	15
1.4 鲟形目鱼类系统发育研究现状.....	18
1.4.1 形态学和细胞遗传水平的研究.....	18
1.4.2 分子水平的研究.....	19
1.5 线粒体 DNA 的分子结构和分子特性.....	20
1.6 线粒体 CO I 基因概况.....	22
1.7 研究的的意义.....	23
第二章 鲟形目鱼类线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 的分子进化研究.....	24
2.1 前言.....	24
2.2 实验材料.....	24
2.2.1 DNA 样品及来源.....	24
2.2.2 主要仪器设备.....	25
2.2.3 酶和试剂.....	26
2.2.4 有关试剂和溶液的配制.....	26
2.2.5 PCR 扩增引物.....	27
2.3 实验方法.....	27

2.3.1	样品 DNA 的提取.....	27
2.3.2	样品 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测.....	28
2.3.3	扩增体系.....	28
2.3.4	扩增程序.....	28
2.3.5	PCR 产物琼脂糖凝胶电测.....	28
2.3.6	PCR 产物的纯化回收.....	29
2.3.7	克隆与测序.....	29
2.4	数据分析.....	30
2.4.1	序列校正.....	30
2.4.2	外类群选择.....	30
2.4.3	序列进化分析.....	31
2.5	结果.....	31
2.5.1	序列信息.....	31
2.5.2	mtCO I 基因的进化模式.....	35
2.5.3	相对速率检验及 mtCO I 基因进化速率估算.....	35
2.6	讨论.....	38
2.6.1	mtCO I 基因序列特点.....	38
2.6.2	mtCO I 基因进化模式.....	39
2.6.3	mtCO I 基因的分子钟检验和进化速率估算.....	40
第三章	通过细胞色素 C 氧化酶亚基 I 序列研究鲟形目鱼类的系统发育.....	42
3.1	前言.....	42
3.2	实验材料.....	42
3.3	实验方法.....	42
3.4	数据分析.....	42
3.4.1	外类群选择.....	43
3.4.2	遗传差异分析.....	43
3.4.3	系统发育分析.....	43
3.5	结果.....	43
3.5.1	遗传差异度和相似度.....	43
3.5.2	系统发育重建.....	44
3.5.2.1	MEGA4.0 的分析结果.....	44
3.5.2.2	PUAP*4.0b10 的分析结果.....	46
3.5.2.3	MrBayesV3.1 的分析结果.....	48
3.6	讨论.....	50

参考文献.....	51
致谢.....	60
附录.....	61

摘 要

鲟形目(Acipenseriformes)是硬骨鱼纲中唯一现存的大型软骨硬鳞鱼类。它具有的古老地位和复杂的生物学特点,使探讨其进化和分类成为一直以来的研究热点。我们通过测定 15 种鲟形目鱼类线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因序列(其中 7 种序列来源于 GenBank,另外 8 种序列为直接测序所得),分析该序列的分子进化特点,并以此构建这 15 种鲟形目鱼类的系统发育树。主要研究结果归纳如下:

1. 经过比对后的 15 条序列长度为 681bp,有保守位点 507 个,变异位点 174 个,简约信息位点 120 个。所有序列没有观察到碱基的缺失或插入。鸟嘌呤核苷酸(G)的平均含量明显低于其余三种核苷酸的平均含量,即序列表现出明显的碱基组成偏向性。

2. 密码子第一位碱基的转换和颠换 Ts/Tv 的比率为 23.1,密码子第三位碱基的 Ts/Tv 为 6.0,密码子第二位点未观测到任何变异。在氨基酸序列的组成上,同样表现出了明显的密码子使用偏倚性。由 Kimura's two-parameter 模型得到的成对序列之间的遗传距离 K 在 0.0074 到 0.1576 之间,鲟科(Acipenseridae)和白鲟科(Polyodontidae)的平均遗传距离为 0.1408。转换和颠换的数目与遗传距离呈良好的线性关系,表明序列进化未达到饱和。

3. 非同义替代的速率远远小于同义替代,其速率比(d_N/d_S)全部小于 1,平均速率比为 0.0221,其中 $d_N=0.0095\pm 0.0025$, $d_S=0.4306\pm 0.0379$ 。中性检验的结果均小于 0, $P>0.1$,表明 mtCO I 序列的进化历程偏离了中性模式,但未达到统计学上的显著水平,负选择(净化选择)是该段基因进化的主要的驱动力。

4. 相对速率检验的结果显示,除闪光鲟(*Acipenser stellatus*)的进化速率稍有不协调外,其他鲟鱼的进化速率保持基本一致。说明分子钟假设在鲟形目的 mtCO I 基因中应该是成立的,根据鲟科和白鲟科的平均遗传距离和分歧时间,应用分子钟公式 $V=K/2T$ 估算 mtCO I 基因的进化速率为 0.048-0.062 替换率/位点/亿年。

5. 根据构建的 15 种鲟形目鱼类的系统发育关系和计算得到的物种之间的遗传差异,提示鲟属鱼类是否可以再细分有待进一步研究。

关键词: 鲟形目; mtCO I; 分子进化; 分子钟; 进化速率; 系统发育

ABSTRACT

Acipenseriformes is the only existing large-sized *Chondrostei* species of the *Osteichthyes*. Their unusual mixture of characters and their ancient status which make them to be the historical ideas for classification and evolution of fishes. We measured 15 different mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene of this group (8 species retrieved from GenBank, 7 species directly sequenced), analyzed the molecular evolutionary characteristics and reconstructed the phylogenetic trees. The main results are as follows:

1. Comparison of 681bp section of the mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I gene revealed 174 variable sites with 120 parsimoniously informative nucleotide positions. No single insertion or deletion was observed. Outgroup sequence length was 681bp. Base composition bias was obvious in those sequences, average Guanine nucleotide (G) level was significantly lower than the other three nucleotides.

2. At the amino acids level, there also observed codon usage bias. The Ts/Tv ratio in the first codon positions was 23.1, in the third codon positions was 6.0, while no variation happened in the second codon positions. The genetic distance (K) between species was ranging from 0.0074 to 0.1576, and the average distance between *Acipenseridae* and *Polyodontidae* was 0.1408 based on Kimura's two-parameter model. The number of both transitions and transversions showed an approximately linear relationship with distance, indicated that those sequences haven't saturated.

3. Nonsynonymous changes were much less frequent than synonymous changes. Pairwise ratio of nonsynonymous to synonymous (d_N/d_S) were all below one. The overall mean ratio of d_N/d_S fixations between species was 0.0221 ($d_N=0.0095\pm 0.0025$; $d_S=0.4306\pm 0.0379$), indicated that purifying selection was the predominant force during its evolution. The neutral test demonstrated the evolution of certain gene was deviate from neutral mode, but it didn't reach statistical significant level ($P>0.1$).

4. According to the result of relative rate test, species remained consistent evolution rate except *Acipenser stellatus*. Based on average genetic distance combined with divergence time between *Acipenseridae* and *Polyodontidae*, we applied the molecular clock formula $V=K/2T$ to estimate the mtCO I gene evolution rate. The result was 0.048-0.062 subs/site year⁻¹10⁻⁹.

5. Whether the genus *Acipenser* should be subdivided needs further investigation

on the basis of phylogenetic relationships and the genetic differences between species.

Key words: Acipenseriformes; mtCO I ; Molecular evolution; Molecular clock;
Evolution rate; Phylogeny

第一章 文献综述

1.1 分子进化和分子钟研究

分子进化学即在分子水平上对生物进化过程的研究。分子水平的进化研究致力于两大问题：重建物种间的进化关系以及了解进化过程的动力和机制。前者属于系统学领域，即重建物种的分子系统发育树，传统上是用形态性状和化石来开展研究。后一个关于分子进化机制的问题则通过估计核苷酸和氨基酸的置换速率以及采用序列数据来检验突变与选择模型进行研究(杨子恒,2008)。

1.1.1 分子进化的中性学说

20 世纪 50 年代，随着分子生物学的兴起，使得人们开始从分子水平上去揭示生命的本质和规律，这也深刻影响着生物进化研究的发展。日本学者木村资生(Motoo Kimura,1968)以及美国科学家(King et al.,1969)提出了中性理论(neutral theory)。分子进化的中性学说认为，种内和种间大多数可见差异不是由自然选择而是由适合度很小的随机突变的固定决定的(Kimura,1968;King and Jukes,1969)。按照中性理论，我们今天看到的遗传变异，无论是种内多态性还是种间分歧，均不取决于自然选择所驱动的有利突变的固定，而是取决于那些事实上没有适合效应(即中性的)突变的随机固定。下面是该理论的一些观点和预测(杨子恒,2008)：

(1)大多数突变是有害的，会被净化选择所清除。净化选择也称负选择(Purifying selection)，指群体中出现有害基因时，携带该基因的个体会因为生存力及育性降低而从群体中淘汰。

(2)大多数无害突变基因在选择上是中性的。中性突变实际上就是指生物群体中广泛存在的多态现象。它是分子水平的变异，但是突变的结果又不影响蛋白质和核酸的功能，即不引起表型的改变，也不影响生物个体的适合度。

(3)中性突变的基因在群体中的固定主要是由随机遗传漂变引起的。中性学说认为选择在进化中不是主流。中性突变造成的不同基因型可以满足群体生存的适应性、稳定性和变异性。中性突变不影响对当前环境的适应性，又不改变遗传的稳定性，同时还积累了适应今后新环境的变异性。它们通过群体中的随机交配，突变的基因以同等机会进行自由组合，从而使一部分中性突变在群体中消失，另一部分则

在群体中固定。种群的分化和形成主要是遗传漂变的结果。

(4)新基因主要是通过基因重复和不等交换产生的。中性学说认为, 现有功能基因对生物体必不可少, 新基因的产生是靠基因重复即中性的累积突变, 将来进化成为适应新环境的具有新功能的基因, 或成为遗传上非活化序列保存在基因组中。

(6)核苷酸置换率等于中性突变率(即总突变率乘以中性突变所占比例)。如果物种间中性突变率恒定, 则置换率也是恒定的。

(7)功能较重要的基因或基因区域的进化较慢。在具有较重要作用或处于较强功能约束下的一个基因中, 中性突变比例较小, 使得核苷酸置换率较低。

(8)种内多态性和种间分歧是中性进化的同一过程的两个阶段。

(9)形态特征(包括生理、行为等)的进化的确是自然选择所驱动的。中性学说关注的是分子水平上的进化。

1.1.2 中性检验

有两种基于 DNA 多态性的统计学检验方法常被用来检验核苷酸变异的中性理论: 一种是 Tajima 检验及其扩展检验, 包括基于突变频率分布的 Tajima's D 检验、Fu and Li's 检验、Fay and Wu's H 检验等已得到广泛应用。另外还有基于非同义突变和同义突变比例的 McDonald-Kreitman 检验(MK 检验)以及 Hudson-Kreitman-Aquade 检验(即 HKA 检验)(周琦等,2004; 林栲等,2009)。基于同义和非同义核苷酸差异进行中性检验的方法还可以通过计算和比较 $\omega = d_N/d_S$ 的大小来检验, 该方法使用广泛。但是单独某一个检验得到显著的结果时并不足以表明选择的存在, 在实际操作时, 通常先采用 d_N/d_S 检验比较序列同义突变和非同义突变速率差异, 然后通过 Tajima's D 检验进行种内多态性比较(周琦等,2004)。

1.1.3 蛋白质的适应性进化

生物体随外界环境条件的改变而改变了自身的特性或生活方式的能力称为适应性。从遗传学角度讲, 适应性进化的概念更加精确, 是指哪些适应了新环境的基因型能生存下来, 并留下更多的子代, 而不适应新环境的基因型只能留下较少的子代, 甚至不留下子代, 逐渐被淘汰掉(刘培生,1995)。

对于特定类群的编码蛋白质基因而言, 处于选择压力下的相应密码子的演化有

以下三种情况：负(净化)选择(Purifying selection)、中性进化(Neutral evolution)和正选择(Positive selection)(即适应性进化)。分子进化中正选择的出现，意味着该基因或蛋白质在进化中可能衍生出新的结构和功能。

在中性进化过程中，将蛋白质编码序列区分为同义置换和非同义置换。蛋白质的非同义-同义置换速率比值 d_N/d_S 是蛋白质编码序列评价选择压力的一种重要测度(张文娟等,2006; 陶敏等,2007; Meiklejohn et al.,2007; Yang et al.,2000a; Yang et al.,2002)。如果不存在任何选择压力，那么同义置换率和非同义置换率是相近的。若将同义置换率作为基准点，我们可以推断自然选择在同义置换固定过程中是起推动作用还是阻碍作用。非同义/同义置换率的比率($\omega=d_N/d_S$)可在蛋白质水平度量选择压力。如果选择对适合度没有影响，则非同义突变将以与同义突变相同的速率被固定，使得 $d_N=d_S$ 及 $\omega=1$ 。如果非同义突变是有害的，则净化选择将降低其固定速率，使得 $d_N<d_S$ 及 $\omega<1$ 。如果非同义突变受到自然选择的青睐，则其被固定的速率将高于同义突变，使 $d_N>d_S$ 及 $\omega>1$ 。因此，非同义突变率显著高于同义突变率即为蛋白质适应性进化的证据。表 1.1 列出在鱼类中存在的部分适应性进化的蛋白质(杨子恒,2008)。

表 1.1 通过同义和非同义置换速率比较被推断为处于正选择下的鱼类部分蛋白质
Table 1.1 List of partial proteins of fishes inferred to experience positive selection depend on d_N/d_S

蛋白质/Protein	有机体/Organism	参考文献/References
MHC	大西洋鲑鱼 <i>Salmo salar</i>	Consuegra et al.,2005
铁传递蛋白	鲑科 Salmonidae	Ford et al.,1999
信息素受体 V1r	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	Pfister et al.,2005
	红尾黑鲨 <i>Epalzeorhynchus erythrurus</i>	
	电光斑马鱼 <i>Danio albolineatus</i>	
	豹纹斑马鱼 <i>Danio frankei</i>	
血红蛋白 β 链	皇冠沙鳅 <i>Botia macracanthus</i>	Bargelloni et al.,1998
	伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i>	
	纽氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus newnesi</i>	
	汉氏拟肩孔南极鱼 <i>Trematomus hansonii</i>	
	博氏南极鳕 <i>Pagothenia borchgrevinkii</i>	
转铁蛋白(离子结合蛋白)	天鹅龙鳕 <i>Cygnodraco mawsoni</i>	Ford,2001
	尖头裸龙鳕 <i>Gymnodraco acuticeps</i>	
感光蛋白	鲑科 Salmonidae	Terai et al.,2002; Spady et al.,2005
钠离子通道基因	丽鱼科 Cichlidae	Zakon et al.,2006
	电鱼	

1.1.4 分子钟假说

分子钟(molecular clock)假说认为 DNA 或蛋白质序列的进化速率随时间或进化谱系保持恒定,即分子进化速率近似恒定。在 20 世纪 60 年代初期,蛋白质序列刚刚出现之时,人们就观察到不同物种中蛋白质序列的差异大致与物种分歧时间成比例。这些观察导致 Zuckerkand 和 Pauling 提出了分子进化钟(molecular evolutionary clock)的概念。

分子钟被看作是氨基酸或核苷酸突变的随机性所导致的随机钟,它不像普通钟表一样以固定时间间隔跳动,而是以一个随机间隔跳动。它允许不同蛋白质进化速率不同,或者说每个蛋白质有其自身固有的分子钟,以不同的速率跳动。并且进化速率的恒定性未必对所有物种适用,很可能只存在于某一类群中。若用公式表示分子钟的概念,则根据 Kimura Motoo,1980 年的研究成果(Kimura,1980),可表示为:

$$V=K/2T$$

其中 T 表示物种的分歧时间;K 表示序列距离,又称序列间的分歧度;V 表示核苷酸或氨基酸的进化速率。

分子钟假说提出以后立即对新生的分子进化领域产生了巨大的影响,如果分子钟在某种有机体类群中的确存在,那么对于研究有机体的进化关系和估计不同有机体间的分歧时间将产生巨大的帮助。最早应用分子钟来估计血红蛋白家族中 α , β , γ 和 δ 球蛋白复制事件发生的时间。从此,分子钟被广泛用于物种分歧时间的估计,并产生了一系列的学术争论,主要是因为分子钟估计的时间常常与化石证据相矛盾。最明显的例子涉及几个进化上的主要事件。第一个是主要动物门类的起源。后生动物(metazoan)的化石类型在 5 亿-6 亿年前的前寒武纪“爆发式”出现,但大部分的分子钟估计要早得多,有时比化石年代早 2 倍。另一个例子是自约 6500 万年前白垩纪和第三纪更迭期恐龙灭绝后,现代哺乳动物和鸟类的起源与分歧时间。分子钟估计又一次得出远早于化石估计的结论。产生如此不一致的原因部分在于化石数据的不完整性。化石展现的是物种产生特征形态性状并生成化石的时间,而分子钟估计表示物种在遗传学上分化的时间,因而化石时间估计必然比分子钟时间估计要晚。另一部分原因也可能是由于分子钟时间估计的方法缺陷及不准确性。尽管有时会导致激烈的争论,但化石与分子证据之间的互动业已成为这个领域前进的动力(杨子恒,2008)。

1.1.5 分子钟检验

分子钟在所研究的核酸或氨基酸序列上是否成立需要应用统计学方法来检验。目前已经发展出几种检验线性分子钟有效性的方法。Sarich 和 Wilson 于 1973 年提出相对速率检验(relative-rate test)的概念(Sarich et al.,1973)以及 Felsenstein 在 1981 年提出似然比检验法(Felsenstein,1981)。这些方法都用于检测分子系统树中不同分枝上核苷酸置换速率的差异显著性(唐先华等,1999)。即采用第三个物种 C(外类群)来检验两个物种 A 和 B 是否以相同的速率进化。如果统计结果显示差异显著,说明该基因的进化速率在这两个物种之间是非恒定的,此时构建的物种系统发育树不具备可取性。需要注意的是,分子钟检验存在一定的局限性。进行相对速率检验时,得到的检验显著性直接依赖于(1) 序列中变异位点的数量和碱基替代率;(2) 内外类群之间遗传距离的大小;(3) 内类群之间分子进化率变化的幅度范围(Bromham et al.,2000)。因此当统计结果是拒绝分子钟假设时,也许并不是否定恒定速率的有力证据。

1.2 分子系统发育

系统发育学(Phylogenetics)是一门研究有机体进化关系的学科,是进化生物学中一项非常重要的内容。系统发育树(Phylogenetic tree)就是描述生物各个类群发生或进化顺序的拓扑结构。在研究从病毒到人类的各种生物的进化历史中,DNA 或蛋白质序列的系统发育分析已经成为一个重要工具。由于不同的基因或 DNA 片段的进化速率存在较大的差异,我们可以通过这些差异来研究几乎所有水平上的有机体间的进化关系。早期的系统发育分析方法主要利用与分类单元一起演化的表型形状、生理形状或化石记录等特征的分析比较来推断物种的进化历史。随着对基因和蛋白质的不断认识,逐渐形成了以 DNA 或蛋白质序列等生物大分子遗传信息来研究系统发育,推断生物进化历史,重建系统谱系的科学,即分子系统发育(molecular phylogenetics)。分子水平系统发育分析对理解物种在分子水平上适应不同环境的进化历程是十分重要的。对 DNA 序列进行系统发育分析大致包括 4 个主要过程:序列比对、选择核苷酸替代模型、构建系统发育树和对发育树的评估。

分子系统学是从生物大分子的信息推断生物进化历史,或者说重建系统发育关系,并以系统树的形式表示出来。近年来一些最重要的分子系统学研究的进展有:

(1)生物进化系统的 3 条主干，即 30 多亿年以前，整个生物界就分为原始真核细胞生物、原始真细菌和原始古细菌三大界。(2)分子系统学的研究支持了真核细胞的共生起源说。(3)分子系统学的研究结果大部分与传统的根据表型比较而建立的系统树相符合，但也有一些与传统的系统进化观点不吻合的结论。(4)揭示了一些过去表型系统树上模糊不明的或争论未决的系统进化问题(唐先华等,2002)。

1.2.1 核苷酸序列替代模型

核苷酸的组合变化和基因的排列顺序反映了有价值的系统发育信息，利用基因组结构和 DNA 序列进行分析的“系统发育基因组学”就是要挖掘蕴藏在 DNA 四种核苷酸和基因排列中的信息来重建各种生命形式的系统发育关系、推断和评价生命形式的起源和进化历程。

成对距离的计算是系统发育重建中计算距离矩阵方法的首要步骤，它采用聚类算法将一个距离矩阵转化为一个系统发育树，因此用于距离计算的核苷酸置换模型构成了多重序列重建系统发育关系的基础。以下以两个在 DNA 序列距离计算中最为常用的遗传模型为例，说明距离数据的计算由来。

(1)JC69 模型

JC69 模型(Jukes et al.,1969)假设每个核苷酸具有同等机率突变为另外 3 种核苷酸中的任何一种，其替换频率为 λ 。用 q_{ij} 表示核苷酸 i 变成核苷酸 j 时的瞬时速率($i,j=T,C,A,G$)，置换率矩阵为：

$$Q=(q_{ij})= \begin{pmatrix} -3\lambda & \lambda & \lambda & \lambda \\ \lambda & -3\lambda & \lambda & \lambda \\ \lambda & \lambda & -3\lambda & \lambda \\ \lambda & \lambda & \lambda & -3\lambda \end{pmatrix}$$

矩阵的每一行的和总为 0，任意一个核苷酸 i 的总置换率为 3λ 。 $q_{ij}\Delta t$ 为任意核苷酸 i 在一个极短的时间间隔 Δt 内变成为核苷酸 j 的概率。该模型是用来估计每一位点核苷酸替代数目最简单的模型。

(2)K80 模型：Kimura 考虑到转换(transition，两种嘧啶或两种嘧啶碱基之间的突变和颠换(transversion，一个嘧啶和一个嘌呤碱基之间的突变)具有不同的频率 α 和

β 。设转换率为 α ，颠换率为 β ，置换率矩阵为：

$$Q = \begin{pmatrix} -(\alpha + 2\beta) & \alpha & \beta & \beta \\ \alpha & -(\alpha + 2\beta) & \beta & \beta \\ \beta & \beta & -(\alpha + 2\beta) & \alpha \\ \beta & \beta & \alpha & -(\alpha + 2\beta) \end{pmatrix}$$

任意一个核苷酸的总置换率为 $\alpha + 2\beta$ ，两条序列经过时间 t 的距离为 $d = (\alpha + 2\beta)t$ 。该模型是目前分子进化研究当中应用较为广泛的模型。

除了 JC69 和 K80 模型外(它们都有对称的置换率,即对所有的 i 和 $j, q_{ij} = q_{ji}$), 对于碱基之间的在特殊情况下的非对称置换, 还有 TN93 模型(Tamura et al.,1993), 以及 TN93 模型的两个特例, HKY85 模型(Hasegawa et al.,1984)和 F84 模型(Hasegawa et al.,1989)。

1.2.2 系统发育的重建

针对基因序列,重建系统发育树的方法可归类为 3 类:一是简约法(parsimony method),最有影响的是最大简约法(parsimony method,MP);二是距离法(distance methods),包括算术平均的不加权对群法(UPGMA),最小二乘法(least-squares,LS),最小进化法(minimum evolution,ME),邻接法(neighbor joining,NJ),其中以 UPGMA 和 NJ 影响最大;三是似然法(likelihood methods),最大似然法(maximum likelihood method,ML)是其中影响最大的一种。以及近年来发展的贝斯推论法(Bayesian inference,BI)(Nei et al.,2000; 张亚平,1996; Felsenstein,1988; 常青等,1998)。

1.2.2.1 距离法

距离法(distance methods)涉及两个步骤:计算物种对之间的遗传距离以及从距离矩阵重建一棵系统发育树。即根据不同的算法,从进化距离最短的开始依次聚类,利用距离矩阵计算出最优树。最简单的距离方法是 UPGMA,这一方法是基于分子钟假设的。最小二乘法(LS)将对距离矩阵作为给定数据,通过匹配那些尽可能近的距离来估计一棵树上的枝长。基于距离建树法中最常见的是邻接法(NJ)和最小进

化法(ME)。

最小进化法(ME)要求根据某种替代模型计算序列间的距离,从而构建进化距离最小的树,作为对于系统树的最优估计。最小进化的理论基础源于 Rzhetsky 和 Nei 的数学证明:当距离使用无偏估计时,树的真实拓扑结构分枝长度和的期望值最小。邻接法(NJ)由 Saitou 和 Nei 于 1987 年提出,由于它计算快又能产生合理的树,因而得以广泛应用。这种方法并不检验所有可能的拓扑结构,但在每一阶段诸物种聚合时,都要应用最小进化原理,被认为是最小进化法的一种简化方法。

1.2.2.2 最大简约法

最大简约法(parsimony method,MP)源于形态性状研究,它利用的只是对简约分析能提供信息的特征。如在 DNA 序列数据中,利用的只是简约信息位点(parsimony-informative sites)。该算法假设 4 种核苷酸或 20 种氨基酸可突变为与自身不同的任何一种,这样对于任一给定的拓扑结构可以计算出用来解释整个进化过程所需核苷酸或氨基酸的最小替代数目。对所有可能正确的拓扑结构进行这种计算并挑选出所需替代数最小的拓扑结构作为最优系统发育树。简约法是可以直接应用原始性状数据,不依赖任何进化模型的统计方法,能快速地分析出大量序列之间的系统发生关系。它更偏向适用于近缘种或序列之间的系统发育推断,对于进化时间较长的物种和序列,由于平行和突变的干扰,得出的结果可能存在置疑。

1.2.2.3 最大似然法

最大似然法(maximum likelihood method,ML)用于系统发生树推断工作的是 Cavalli-Sforza 和 Edwards 在 1967 年对基因频率数据的分析。后来 Felsenstein 于 1981 年提出了一种用最大似然法构建发育树的算法。它需首先确定序列进化的模型,目前使用较多的是一些较简单的模型,如 JC 模型, K80 二参数模型及一般二参数模型。这些模型都是建立在一定假设基础上,然后基于一定的模型考虑两个分类单元间的关系,找到枝的长度。这个过程需要寻找在某一进化距离上由第一种序列真正转换成第二种序列的可能性,并确定在最大可能下的进化距离。接着将多个分类单元所构成的所有可能树作为最佳树,对重建每个树的统计量进行似然估计,最后通过对树长度的优化,获得最佳树参数的最大似然估计。因此以最大似然法构建的系

统发育树在很大程度上依赖于对核苷酸替代模型的选择。但并非替代模型越复杂结果就越理想。似然法运算强度最大，对于分类群较多时显得特别费时。

1.2.2.4 贝斯推断法

贝斯法(Bayesian inference)是近来发展的一种新的系统进化分析方法(Rannala et al.,1996)。和最大似然法相似，属于基于似然率的系统重建方法。它涉及两个基本概念：先验概率(prior probability)和后验概率(posterior probability)。树的先验概率是指对进化树未进行任何观测时的概率，具体来说就是认为所有进化树都有相同的可能性；树的后验概率是指通过观测进化树的条件概率，即在给定的序列数据条件下，某进化树正确的概率。因而后验概率最大的进化树为最优树。它的基本思路都是在一个假定的进化模型基础上去寻找最优的一棵树，使其与进化模型和数据集一致。贝斯分析方法一个明显优势在于可以处理大数据集，解决运算量巨大，计算强度高。因此，可以利用复杂的核苷酸替换模型快速分析大的数据集。它既保留了最大似然法的基本原理，又引进马尔可夫链的蒙特卡罗算法(MCMC)，使我们能够根据分子进化的现有理论和各种模型用概率重建系统发育关系。至于这种方法推断系统发育所产生的一个后验概率分布值是更准确的代表了系统树的可靠性还是过高估计了分支的支持程度仍然有所争议。

1.2.3 系统发育方法的评价

比较不同方法构建的系统发育树时，尽管 Bootstrap 检验可以大致判断分支是否合理，但检验值低的分支不一定就该舍弃。在涉及不同树重建方法的相对准确性时也会出现互相冲突的观点。因而有必要比较几种建树的方法，从而对特定的序列选择合适的建树方法。以下这些观察结果是被普遍接受的(Huelsenbeck,1995b; Nei, 1996; Goldman,1998; Felsenstein,1988)。

(1)在分子钟不成立的情况下，假定分子钟的方法(如 UPGMA)效果很差，故应采用无分子钟假定来推断无根树的方法。尽管如此，UPGMA 方法对高度相似的序列(如被认为具有分子钟的群体数据)还是适用的。

(2)当序列高度分歧或包含许多对位排列间隔时，距离法效果不佳，主要是因为难以获得可靠的距离估计。

(3)序列分歧度水平对树重建方法的性能影响很大。高度相似序列缺乏信息，高度分歧序列因置换可能已包含太多噪声。数据中的信息量在中等水平的分歧时最优。

在进行系统发育分析时，我们往往难以判断哪种方法最佳，所以最好同时使用多种方法建树，多种方法所得系统树的一致，将大大提高结果的可靠性(张亚平,1996)

1.2.4 系统发育分析软件

一些在分子系统发育分析中广泛应用的程序或软件包见表 1.2:

表 1.2 系统发育分析常用程序和软件包
Table 1.2 Procedures and packages used for phylogenetic analysis

软件名称	网址	说明
CLUSTAL	ftp://ftp.ebi.ac.uk 的目录 pub/software 下载	CLUSTAL 是一个多重序列自动对位排列程序，具有命令行界面的 CLUSTALW 和图形界面的 CLUSTALX
PHYLIP	http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html	PHYLIP(Phylogeny Inference Package)包括大约 30 个系统发育重建的简约法、距离法和似然法程序的软件包。这些程序都是 C 语言编写而成，可以在任一操作平台上使用。可以处理包含 DNA 和蛋白质序列在内的任何类型的数据
PAUP*4	http://paup.csit.fsu.edu/ 连接到 Sinauer 站点	PAUP*4(Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods),是一个广泛用于分子和形态数据的系统发育分析软件包，其中采用了简约法、距离法和似然法
MrBayes	http://mrbayes.csit.fsu.edu/	MrBayes 是一个对 DNA、蛋白质和密码子序列进行系统发育贝斯推断的程序。该程序采用马尔可夫链蒙特卡罗算法在树空间中进行搜索，生成树拓扑结构的后验分布、枝长和其他置换参数
MEGA	http://www.megasoftware.net/	MEGA 采用距离法和简约法进行距离计算和系统发育重建。它用 CLUSTAL 来完成多重序列对位排列
MacClade	http://www.macclade.org/ 连接到 Sinauer 站点	MacClade 是一个用于祖先状态重建的 Macintosh 程序，它可以分析分子数据以及离散形态形状，以追溯沿进化树分枝的变化

1.3 鲟形目鱼类分类地位和资源状况

鲟形目鱼类是一类在鱼类乃至脊椎动物进化史上占有重要地位的古老鱼类，它是起源最早的现存脊椎动物类型之一，为软骨硬鳞下纲(Chondrostei)中现仅存的唯一的目(陈细华,2007)。由于其背鳍与臀鳍的鳍条数多于支鳍骨数目，亦称古鲟鱼类(Palaeopterygii)。按地质年代的划分，鲟鱼分为两大类型，即古鲟鱼类和近代鲟鱼类。其中古鲟鱼类包括两个科，即软骨硬鳞科(Chondrosteidae)和北票鲟科(Peipiaosteidae)，都已灭绝。近代鲟鱼类包括鲟科(Acipenseridae)和白鲟科(Polyodontidae)(孟庆闻等,1995;周忠和,1992)。最早的鲟鱼化石可以上溯到早侏罗纪时代(Lower Jurassic)，距今约 2 亿年历史(Bemis et al.,1997a)。一般认为鲟鱼起源于欧洲的古鲟类(Paleonisciform)部分种群，早期多样性发生在亚洲(Bemis et al.,1997b)。

1.3.1 分类地位

从起源的地理分布来看，除中华鲟(*Acipenser sinensis*)珠江种群和墨西哥湾鲟(*Acipenser oxyrinchus desotoi*)越过了北回归线，其他所有已知化石种和现生种均来源于全北区(Bemis et al., 1997a)。主要有三个分布密集区：一个是欧洲东部的里海、黑海、咸海地区；一个是环绕北太平洋两岸的亚洲东部和北美洲西部地区；另一个为北美洲东海岸地区(Bemis et al.,1997a; Billard et al.,2001)(表 1.1)。我国鲟类隶属 2 科 3 属共 8 种，主要分布在长江水系、黑龙江水系和西北的新疆三个区域内。即栖息于黑龙江水系的施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)和鳇(*Huso dauricus*)，栖息于长江水系的中华鲟(*Acipenser sinensis*)、白鲟(*Psephurus gladius*)和长江鲟(*Acipenser dabryanus*)，其次是上世纪 80 年代分布于新疆地区伊犁河的裸腹鲟(*Acipenser nudiventris*)、额尔齐斯河的小体鲟(*Acipenser ruthenus*)和西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)(Wei et al.,2004;石振广等,2002)。根据传统的形态学分类方法，现生鲟形目鱼类有 2 科 6 属 27 种，其分类阶元如下：

脊椎动物门 Vertebrata

硬骨鱼纲 Osteichthyes

辐鳍亚纲 Actinopterygii

软骨硬鳞总目 Chondrostei

鲟形目 Acipenseriformes

鲟科 Acipenseridae

鲟亚科 Acipenserini

鲟属 *Acipenser*(17 种)

鳊属 *Huso*(2 种)

铲鲟亚科 Scaphirhynini

铲鲟属 *Scaphirhynchus*(3 种)

拟铲鲟属 *Pseudoscaphirhynchus*(3 种)

白鲟科 Polyodontidae

白鲟属 *Psephurus*(1 种)

匙吻鲟属 *Polyodon*(1 种)

其中, 大西洋鲟(*Acipenser oxyrinchus*) 有 2 个亚种, 分别是北方亚种大西洋鲟(*A.o.oxyrinchus*) 和南方亚种墨西哥湾鲟(*A.o.desotoi*); 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) 有 3 个亚种, 分别是西伯利亚鲟(*A.b.baerii*)、Lena 河鲟(*A.b.stenorrhynchus*) 和贝加尔鲟(*A.b.baicalensis*)。

1.3.2 资源状况

在过去的 200 年间, 世界鲟鱼的年总产量在 1.5-4.0 万吨之间(图 1.1)(Pikitch et al.2005; 危起伟, 2003)。东欧的里海、黑海、咸海和亚速海地区的产量占世界产量的 80%以上。全球以俄罗斯鲟、闪光鲟和欧洲鳊的产量最大, 其次是西伯利亚鲟、湖鲟、大西洋鲟和高首鲟, 然后是小体鲟、欧洲鲟、施氏鲟、鳊、中华鲟和匙吻鲟(危起伟,2003)。自 20 世纪 70 年代末以来, 全球范围内由于栖息环境的污染、大型水利工程的兴建、以及过度捕捞等因素的影响, 野生鲟鱼资源数量急剧下降, 分布区逐渐减少。世界鲟鱼总产量从 1982 年的 2.8 万吨直降至 1999 年的不足 2 千吨(Billard et al.,2001)。有资料表明, 上世纪全世界主要地区的鲟鱼数量下降了 70%。目前世界鲟鱼自然捕捞产量主要得益于人工繁殖, 如欧洲鳊、俄罗斯鲟、裸腹鲟和闪光鲟等均依靠人工放流来维持其种群数量。

我国的鲟鱼类资源衰退亦较为显著。80 年代黑龙江的鲟鳊鱼(施氏鲟、鳊的统称)的最高产量为 452 吨, 90 年代最高产量为 248 吨, 而到了 90 年代末至今鲟

鳊鱼年产量已不足百吨(王云山,2007)。自 1981 年葛洲坝水利枢纽截流以来,长江中华鲟的种群结构发生了明显的变化,1990 年开始,雄性低龄鱼比例减少了 89.87%(Wei et al.,1997)。Qiao 采用水声学方法评估 2002 年第一批产卵活动前后,中华鲟繁殖群体仅接近 300 尾(Qiao et al., 2006; 张辉,2009)。而白鲟几乎发现不到踪迹。长江鳊鱼的数量也发生了剧减,在葛洲坝下几乎看不到踪影(Zhuang et al,1997)。

目前,现存鲟形目鱼类的所有种类的资源量均大幅度下降,或处于濒危状态。按世界自然保护联盟(International Union for the Conservation of Nature and Nature Resources,IUCN)1994 年和 2001 年的濒危物种红色目录等级,全球有 6 种鲟鱼处于极危状态(Critical Endangered, CR),11 种鲟鱼处于濒危状态(Endangered, EN),6 种鲟鱼处于易危状态(Vulnerable, VU),只有少数几种鲟鱼尚处于近危(Near Threatened, NT)或无危(Least Concern, LC)状态。1997 年在津巴布韦召开的国际濒危动植物种贸易公约(CITES)大会形成“10.12”决议,将世界所有鲟鱼种类列入濒危物种国际贸易公约附录保护物种,其中短吻鲟(*Acipenser brevirostrum*)和欧洲鲟(*Acipenser sturio*)为公约附录 I 保护物种,其他种类为公约附录 II 保护物种,并于 1998 年 4 月日正式生效。现生鲟形目鱼类种类及濒危等级见表 1.3。

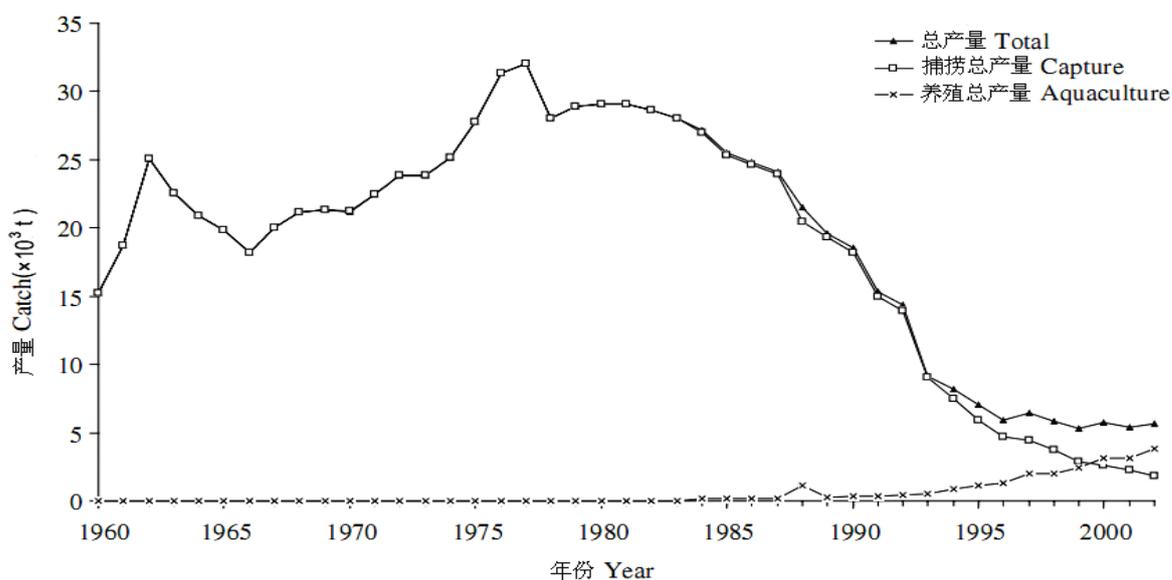


图 1.1 世界鲟鱼的总产量
Fig. 1.1 World catch of sturgeon and paddlefish
 (自 Pikitch et al.,2005)

表 1.3 现生鲟形目鱼类种类及濒危等级(Pikitch et al.,2005; Billard et al.,2001)

Table 1.3 List of extant species and threatened status of Acipenseriformes

Taxon	English name	Chinese name	Distribution range	Status*
Acipenseridae(鲟科)				
Huso(鳊属)				
<i>H. dauricus</i>	Kaluga	达乌尔鳊	黑龙江流域	EN(1996)
<i>H. huso</i>	Beluga/Giant	欧洲鳊	亚得里亚海、黑海、里海和亚速海	EN(1996)
Acipenser(鲟属)				
<i>A. nudiventris</i>	Ship	裸腹鲟	里海、黑海和咸海流域	EN(1996)
<i>A. schrenckii</i>	Amur	施氏鲟	黑龙江流域	EN(1996)
<i>A. baerii</i>	Siberian	西伯利亚鲟	西伯利亚	VU(1996)
<i>A. ruthenus</i>	Sterlet	小体鲟	Ponto-里海区、西伯利亚	VU(1996)
<i>A. transmontanus</i>	White	高首鲟	太平洋东北海岸	LC(2004)
<i>A. stellatus</i>	Stellate/Sevruga	闪光鲟	黑海、里海和亚速海	EN(1996)
<i>A. sturio</i>	European/Atlantic	欧洲鲟	大西洋东北海岸、波罗的海、地中海和黑海	CR(1996)
<i>A. oxyrinchus</i>	Atlantic/Gulf	大西洋鲟	大西洋西北海岸	NT(2006)
<i>A. persicus</i>	Persian	波斯鲟	黑海和里海	EN(1996)
<i>A. mikadoi</i>	Sakhalin	库页岛鲟	北太平洋亚洲东海岸	EN(1996)
<i>A. medirostris</i>	Green	中吻鲟	太平洋东北海岸	NT(2006)
<i>A. brevirostrum</i>	Shortnose	短吻鲟	北美东海岸	VU(2004)
<i>A. naccarii</i>	Adriatic	纳氏鲟	Ponto-里海区	VU(1996)
<i>A. fulvescens</i>	Lake	湖鲟	北美五大湖区、加拿大南部湖泊	LC(2004)
<i>A. gueldenstaedtii</i>	Russian	俄罗斯鲟	黑海、里海和亚速海	EN(1996)
<i>A. dabryanus</i>	Yangtze/Dabry's	长江鲟	长江	CR(1996)
<i>A. sinensis</i>	Chinese	中华鲟	长江	EN(1996)
Scaphirhynchus(铲鲟属)				
<i>S. albus</i>	Pallid	密苏里铲鲟	密西西比河和密苏里河	EN(2004)
<i>S. platorynchus</i>	Shortnose	密西西比铲鲟	密西西比河和密苏里河	VU(2004)
<i>S. suttkusi</i>	Alabama	阿拉巴马铲鲟	阿拉巴马和密西西比河流域	CR(2004)
Pseudoscaphirhynchus(拟铲鲟属)				
<i>P. fedtschenkoi</i>	Syr Dar Shovelnose	锡尔河拟铲鲟	哈萨克斯坦的 Syr-Dar 河	CR(1996)
<i>P. kaufmanni</i>	Large Amu Dar Shov.	阿姆河大拟铲鲟	土库曼斯坦、乌兹别克斯坦和塔吉克斯坦的 Amu-Darya 河	EN(1996)
<i>P. hermanni</i>	Small Amu Dar Shovel.	阿姆河小拟铲鲟	乌兹别克斯坦 Amu-Darya 河	CR(1996)
Polyodontidae(白鲟科)				
Pspurus(白鲟属)				
<i>P. gladius</i>	Chinese Paddlefish	白鲟	长江	CR(1996)
Polyodon(匙吻属)				
<i>P. spathula</i>	N.American Paddlefish	匙吻鲟	密西西比河	VU(2004)

*濒危等级及评估年份摘自 IUCN 官方网站

EX=extinct 绝灭; EW=extinct in the wild 野外绝灭; CR=critically endangered 极危;
EN=endangered 濒危; VU=vulnerable 易危; NT=near threatened 近危; LC=least concern 无危

1.4 鲟形目鱼类系统发育研究现状

由于鲟鱼的分类地位处于软骨鱼类和真骨鱼类之间, 兼具许多软骨鱼类和硬骨鱼类的特征, 研究这些软骨硬鳞鱼类的系统进化对了解软骨鱼和硬骨鱼的分化以及亲缘关系有重要作用。但是这一类群的系统发育的研究仍然还处于起步阶段, 甚至连最基本的鲟属是否属于单起源的问题尚未得到解决 (Bemis et al.,1997a)。目前对鲟形目鱼类系统发育的研究主要采用了形态学 (Findeis,1997; Bemis et al.,1997a; Artyukhin,2006), 细胞遗传学 (Artyukhin,1995; Birstein et al.,1997a; 张四明等,1999) 和分子生物学手段。然而各种方法得到的结果却不尽一致。尤其是分子方面的证据对最初基于形态学所得出的分类系统关系提出了较多的置疑。例如欧洲鳊 (*Huso huso*) 和鳊 (*Huso dauricus*) 在分子遗传上的差异比形态上的差异较大 (Fontana et al.,2001)。

1.4.1 形态学和细胞遗传学的研究

根据形态学特征, 大部分学者都普遍认同将鲟形目分为鲟科 (Acipenseridae) 和白鲟科 (Polyodontidae) 两个科, 其中白鲟科包括两个属 (白鲟属 *Psephurus* 和匙吻属 *Polyodon*), 鲟科包括四个属 (拟铲属 *Pseudoscaphirhynchus*、铲鲟属 *Scaphirhynchus*、鳊属 *Huso* 和鲟属 *Acipenser*) (Fontana et al.,2001)。

基于细胞遗传学的研究表明, 鲟鱼类全为多倍体起源的鱼类, 它的染色体由大染色体和微染色体构成。目前关于其染色体数或 DNA 含量与倍性进化关系有两种观点。第一种认为鲟鱼的染色体数目可分为两组 (表 1.4), 第一组包含染色体数在 100-120 条, 第二组包含染色体数在 240-270 条, 认为染色体数在 120 条左右为四倍体 (Birstein et al.,1987)。Fontana 通过对染色体数分别为 120 左右和 240 左右的几种鲟鱼的核仁组织区 (NOR) 银染认为, 染色体数为 120 左右的鲟鱼为二倍体, 染色体数为 240 左右的为四倍体 (Fontana,1994)。部分鲟鱼的核型已确定 <http://dns.unife.it/geneweb/sturgeon.html> (Fontana et al.,2001)。尽管仅靠细胞遗传学数据不能准确推断鲟形目系统关系, 但对于理解鲟鱼进化演变很有帮助。

表 1.4 部分鲟鱼的染色体数目(自 Fontana et al.,2001)
Table 1.4 Chromosome number in the Acipenseriformes

种类/Species	染色体数目/Chromosome No.
组 A/Group A	
裸腹鲟 <i>Acipenser nudiiventris</i>	2n=118±3
大西洋鲟 <i>Acipenser oxyrinchus</i>	2n=99-112
小体鲟 <i>Acipenser ruthenus</i>	2n=116±4
闪光鲟 <i>Acipenser stellatus</i>	2n=118±2
欧洲鲟 <i>Acipenser sturio</i>	2n=116±4
达氏鳊 <i>Huso dauricus</i>	2n=120
欧洲鳊 <i>Huso huso</i>	2n=116±4
密西西比铲鲟 <i>Scaphirhynchus platorhynchus</i>	2n=112
匙吻鲟 <i>Polyodon spathula</i>	2n=120
组 B/Group B	
西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	2n=249±5
俄罗斯鲟 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	2n=250±8
中吻鲟 <i>Acipenser medirostris</i>	2n=249±8
纳氏鲟 <i>Acipenser naccarii</i>	2n=239±7
波斯鲟 <i>Acipenser persicus</i>	2n=258±2
施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>	2n=240
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	2n=264±4
高首鲟 <i>Acipenser transmontanus</i>	2n=271

1.4.2 分子水平的研究

辐鳍亚纲(Actinopterygii)包含有四类古老鱼类, 鲟形目 (Acipenseriforms), 多鳍目 (Polyteriforms), 雀鳢科(Lepisosteids)和弓鳍属(*Amia*)。这四类鱼与硬骨鱼类的系统进化关系许多学者就形态学(Bemis et al.,1997b)和分子方面(Venkatesh et al.,2001; Inoue et al.,2003)的资料进行过整理研究。分子方面的研究结果极大地支持硬骨鱼类属单系, 并与鲟形目、雀鳢科和弓鳍属的进化枝并列成姐妹种, 而多鳍目鱼类处于辐鳍亚纲系统发育的基础地位(Inoue et al.,2003)。在鲟形目系统发育方面以线粒体基因为分子标记研究系统进化的报道相对较多, 最早开始这方面的研究是利用 RFLP 技术分析线粒体全序列及控制区序列在北美四种鲟鱼中多态性, 并认为高首鲟和中吻的亲缘关系较近(Brown et al.,1996)。但是这个结论并未得到 Birstein 分别用 Cyt b(270bp)、12S rRNA(189bp)、16S rRNA(318bp)和核基因 18S rRNA(229bp)构建的系

统发育树的证明(Birstein et al.,1997),与此同时,这四种基因得到的结果之间也存在较大差异。当将这四种基因联合在一起,用最大简约法构建系统树得出如下三个结论:(1)铲鲟属和拟铲属是姐妹种的假设不成立;(2)鲟属可能是单起源;(3)达氏鳇是鲟属的姐妹种。后两个结论的到了 Birstein 和 Comincini 应用 RAPD 分析技术的证明(Birstein et al.,1998; Comincini et al.,1998)。线粒体基因作为系统发育很好的材料被许多学者青睐,后来的研究包括用 12S rRNA、mtCO II、tRNA_{Phe}、tRNA_{Asp} 基因构建的北美九种鲟鱼的系统树(Krieger et al.,2000);用 ND4L-ND4 基因进行亲缘关系分析(张四明等,1999);Peng 和 Ludwig 分别利用最大简约法和最大似然法对 Cyt b 基因构建的系统发育树等(Peng et al.,2007; Ludwig et al.,2000; Ludwig et al.,2001)。这些研究或多或少存在不一致性,因此 Krieger 在综合分析了线粒体 8 个基因共 4406bp 的序列之后提出,建议未来将研究焦点转移到核基因上,以期得到与线粒体某些基因相似的结果(Krieger et al.,2008)。

由于鲟鱼之间非常容易杂交且是多倍性的鱼类,核基因大小在种内存在较大变异,因此用核基因研究鲟鱼的系统发育关系的研究相对较少。仅见 Rozhkovan 以初始的 18S rRNA 序列分析鲟鱼的系统发育(Rozhkovan et al.,2009),因为在鲟鱼中 18S rRNA 序列存在不同的等位基因(Krieger et al.,2002a; Krieger et al.,2004; Krieger et al.,2006)。研究结果支持鲟属单起源的设想,并与 Artyukhin 基于 28 项形态学指标的分类相吻合(Artyukhin,2006)。另外还有 Robles 对核糖体 RNA 第二个基因家族 5S 和 NTS 的研究,同样发现这两段基因在鲟鱼中呈现多态性,并利用这些多态序列构建了 13 种鲟鱼的系统发育树,发现了种内的变异比种间的分歧大(Robles et al.,2005)。另外还可见 Fontana 关于 18S、28S 和 5S 这两大核糖体基因家族在染色体上定位的研究,结果发现在鲟鱼这种古老鱼类中,这两大基因家族存在于同一条染色体上(Fontana et al.,2003)。

1.5 线粒体 DNA 的结构与分子特性

鱼类线粒体 DNA 和其他脊椎动物的 mtDNA 一样,呈共价闭合环状,包括一条重链(H)和一条轻链(L),是细胞核外具有自主复制、转录和翻译能力的遗传因子。由 37 个基因和两段非编码区组成。全长一般在 16.5 千碱基对(kb)左右(Broughton et al.,2001)。37 个基因中包括 13 个蛋白质基因、2 个 rRNA 基因和 22 个 tRNA 基因。

其中, 13 个蛋白质基因分别是细胞色素 C 氧化酶 I、II、III 亚基(CO I、CO II、COIII)、细胞色素 b 基因(Cyt b)、ATP 合成酶亚基 6 和 8(ATPase6 和 ATPase8)、NADH 脱氢酶亚基 1-6(ND1-6)和 4L(ND4L); 16S rRNA 和 12S rRNA 两个 rRNA 基因; 22 个 tRNA 基因为: TA、TR、TN、TD、TC、TQ、TE、TG、TH、TI、TL₁、TL₂、TK、TM、TF、TP、TS₁、TS₂、TT、TW、TY、TV。除编码亮氨酸(Leu)和丝氨酸(Ser)的 tRNA 基因是双拷贝, 其余都是单拷贝。L 链仅编码 ND6 基因和 8 个 tRNA 基因(Pro、Tyr、Ser、Ala、Asn、Cys、Glu、Gln), 其余基因皆由 H 链编码 (郭新红等,2004)(图 2.1)。两段非编码区中一段为控制区(control region), 又称 D 环区(displacement-loop region), 另一段是 L 链复制起始区。D 环区位于 tRNA_{Pro} 和 tRNA_{Phe} 基因之间, 是整个线粒体基因组序列和长度变异最大的区域, 但其中也包含保守片段。L 链复制起始区长约 30-50bp, 位于 tRNA_{Asn} 和 tRNA_{Cys} 基因之间, 该段可折叠成茎环结构。所有基因呈不均一分布, 但基因之间的排列顺序却是十分保守的(Broughton et al.,2001)。

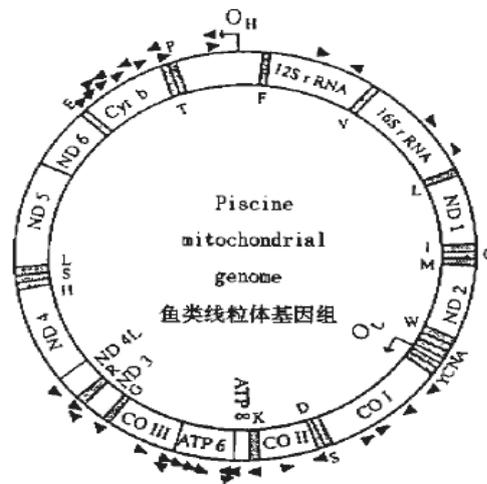


图 2.1 鱼类线粒体基因组

Fig. 2.1 Fish mitochondrial genome
(自 吕国庆等,1998)

mtDNA 有许多适合于进化和系统学研究的特性: (1)广泛存在于动植物各组织中, 易于分离与纯化; (2)在整个分子、基因和位点三个水平上都易于确定同源关系; (3)严格的母系遗传, 沿谱系垂直传递避免了趋同进化的影响; (4)分子量小, 结构简单, 各基因之间排列十分紧凑, 无内含子、转座子和间隔区; (5)相对于核基因其进化速率快, 为核基因的 5-10 倍(夏德全等,1998)。且由于受选择压力的不同导致不同区域的基因进化速率存在差异。从演化速率高的编码区(CR)、速率中等的 Cyt b

和 ND4 基因、到最为保守的 16S rRNA 和 12S rRNA 基因，可以根据研究内容的不同和研究对象的系统分类关系选择待测分析区域。例如，D-Loop 比较适合于群体遗传学及近缘种间的分析研究，12S、16S rRNA 及 CO 氧化酶亚单位等适合种属间值科级以下分类阶元的探讨(潘宝平等,2005); (6)线粒体基因的产物可与数百种核基因产物相互作用，使其成为研究协同进化模式的理想材料(Curole et al.,1999; Wu et al., 2000)。由于线粒体基因组的诸多优点，已成为研究鱼类群体遗传学和系统学研究的理想材料(肖武汉等,2000)。目前在鲟形目鱼类中已获得线粒体全基因序列的种类见表 2.1

表 2.1 目前 GenBank 数据库中已测定的鲟形目鱼类 mtDNA 全序列的序列号、大小及参考文献
Table 2.1 List of mtDNA sequenced of Acipenseridae at present,with accession No.,sizes and references

科 Family	属 genus	种 Species	序列号 Accession No.	大小(bp) Size(bp)	参考文献 References
鲟科	鳊属	欧洲鳊			Dunn
Acipenseridae	<i>Huso</i>	<i>Huso huso</i>	AY442351	16760	unpublished
		达氏鳊			Peng et al., 2007
	<i>Acipenser</i>	<i>Acipenser dabryanus</i>	AY510085	16438	
		俄罗斯鳊			
		<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	NC012576	16594	unpublished
		闪光鳊			Arnason et al., 2004
<i>Acipenser</i>	<i>Acipenser stellatus</i>	AJ585050	16537		
	高首鳊				
	<i>Acipenser transmontanus</i>	AB042837	16692	Inoue et al., 2003	
	铲鳊属	密苏里铲鳊			Inoue et al., 2003
	<i>Scaphirhynchus</i>	<i>Scaphirhynchus albus</i>	AP004354	16493	
白鲟科	白鲟属	白鲟			Peng et al., 2007
Polyodontidae	<i>Psephurus</i>	<i>Psephurus gladius</i>	AY571339	16483	
	匙吻鲟属	匙吻鲟			Peng et al., 2007
	<i>Polyodon</i>	<i>Polyodon spathula</i>	AY510086	16520	

1.6 线粒体 CO I 基因概况

细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因是编码细胞色素氧化酶亚基 I 蛋白的遗传因子。细胞色素 C 氧化酶由 10 个亚基构成，分别称为 I、II、III...，其中最大和疏水性最强的三个亚基都是由线粒体 DNA 转录合成的，分别为 mtCO I、mtCO II 和 mtCO

III。细胞色素 C 氧化酶含有两种细胞色素(细胞色素 a 和 a₃)以及两个铜离子(Cu_A 和 Cu_B),是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,在呼吸链电子传递和质子的跨膜反应中具有重要作用(王镜岩等, 2002)。由于 mtCO I 具有相对保守性,扩增的序列很少存在插入和缺失,同时也具有多态性较高、进化速率适中等特点,因此在系统发育,种间鉴定及遗传多样性研究中有较好的应用,常被用来分析亲缘关系较近的种、种下分类单元以及地理种群之间的关系(郭晓华等,2009; 陈姝君等,2008; Zardoya et al., 1996)。在鲟形目鱼类的研究中还未见关于这段基因的报道。

1.7 研究的目的是和意义

鲟形目鱼类在鱼类乃至整个脊椎动物进化史上占有极其重要的地位,从不同层次研究这种原始古老的软骨硬鳞鱼类的系统进化已达成共识。本研究拟在测定鲟形目 15 种鱼类的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因编码区部分序列的基础上,分析基因编码区序列之间的碱基替换特点,并进一步探讨 3 方面的问题:

- (1)阐明线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因的分子进化特征;
- (2)通过相对速率检验检验核苷酸进化速率的均衡性,验证分子钟假说是否成立并推算线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因的进化速率;
- (3)提出可供参考的部分鲟形目鱼类系统进化的客观依据。

第二章 鲟形目鱼类细胞色素氧化酶亚基 I 的分子进化研究

2.1 前言

线粒体是一种几乎存在于所有真核生物的细胞器，与能量的代谢、凋亡、衰老以及疾病相关，是氧化磷酸化的场所。1890 年，Altaman 首次发现线粒体，当时认为它可能是共生于细胞内可以营独立生活的细菌，命名为 Bioblast。1898 年 Benda 首次将其命名为线粒体(Mitochondrion)。19 世纪 60 年代，人们发现线粒体具有自己的基因组，即线粒体基因组。20 世纪 70 年代，Margulis 提出的线粒体的内共生起源理论(Endosymbiont Hypothesis)是线粒体起源学说中较为普遍承认的学说。

2.2 实验材料

2.2.1 DNA 样品及来源

实验共用 15 种鲟鱼。其中 7 种鲟鱼的细胞色素氧化酶亚基 I 的同源序列信息来源于 GenBank，另外 8 种鲟鱼的目的基因序列需人工测定，样本来源于中国水产科学研究院长江水产研究所用酒精保存的鲟鱼尾鳍。实验用鲟鱼种类及来源见表 2.2

表 2.2 实验用鲟鱼种类及来源
Table 2.2 List of species used in this study with GenBank accession numbers and references

种类/Species	序列号/Accession Nos.	参考文献/Reference
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	GQ502670	本文
俄罗斯鲟 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	GQ502671	本文
纳氏鲟 <i>Acipenser naccarii</i>	GQ502672	本文
欧洲鲟 <i>Acipenser sturio</i>	GQ502673	本文
小体鲟 <i>Acipenser ruthenus</i>	GQ502674	本文
西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	GQ502675	本文
施氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>	GQ502676	本文
鳊 <i>Huso dauricus</i>	GQ502677	本文
欧洲鳊 <i>Huso huso</i>	AY442351	Dunn et al.unpublished
高首鲟 <i>Acipenser transmontanus</i>	AB042837	Inoue et al.2003
闪光鲟 <i>Acipenser stellatus</i>	AJ585050	Arnason et al.2004
长江鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	AY510085	Peng et al.2007
密苏里铲鲟 <i>Scaphirhynchus albus</i>	AP004354	Inoue et al.2003
白鲟 <i>Psephurus gladius</i>	AY571339	Peng et al.2007
匙吻鲟 <i>Polyodon spathula</i>	AY510086	Peng et al.2007

2.2.2 主要仪器设备

DYY-12型电泳仪	北京六一仪器厂
DYY-III型琼脂糖水平电泳槽	北京六一仪器厂
BIO-RAD型凝胶成像分析系统	美国SIM公司
PTC-200型PCR扩增仪	美国MJ
GZX-DH电热恒温干燥箱	上海铁通医疗器械厂
高速冷冻离心机5415R	德国Eppendorf 公司
SW-CJ-1F型单人双面净化工作台	苏州净化设备有限公司
HH数显恒温水浴锅	江苏金坛瑞华仪器
WD-9405B水平摇床	北京六一仪器厂
TH-2型恒温振荡器	江苏太仓市实验设备厂
电子天平	上海恒平,MP2002
超低温冰箱	日本SANYO
微量移液器	波兰HTL

2.2.3 酶和试剂

DNA marker, dNTP 混合物, *Taq* DNA 聚合酶和载体 PMD18-T 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; 引物由上海生工生物工程公司合成; Proteinase K 购自 Roche; 100bp ladder DNA marker 和 DNA 回收试剂盒购自 AXYGEN(爱思进生物技术有限公司); 溴化乙锭(EB); EDTA, Tris 碱, 十二烷基硫酸钠(SDS), 丙烯酰胺等常规试剂均为进口分析纯; 胰化蛋白胨, 酵母提取物, 氨苄青霉素, 琼脂粉, 氯化钠, 0.1mol/L CaCl₂ 溶液。

2.2.4 有关试剂和溶液的配制

2.2.4.1 DNA 提取所用溶液的配制

- (1) HOM Buffer: 称取 29.8g Na₂EDTA·2H₂O 溶于 700ml 双蒸水中, 加入 12.1g Tris base(MW 121.1)碱, 加入 5g SDS, 用 NaOH 调至 pH=8.0, 定容至 1000ml 室温保存。
- (2)蛋白酶 K 贮存液(20mg/ml): 瓶装 100mg 的蛋白酶 K 溶于 5ml 灭菌三蒸水中, -20℃ 贮存备用。
- (3) 4.5mol/L 的氯化钠: 称取 263.25g 氯化钠溶于 700ml 双蒸水中, 定容至 1000ml。
- (4) 75% 的乙醇: 750ml 的乙醇溶于 200ml 的双蒸水, 定容至 1000ml。
- (5) TE 缓冲液: 1M Tris-HCL(PH=8.0) 2ml, 0.5M EDTA(PH=8.0) 0.2ml 与 97.8ml 的双蒸水混匀。

2.2.4.2 琼脂糖凝胶电泳及检测所用的溶液配制

- (1) 50×TAE 储备液: 称取 242g Tris 碱溶于 650ml 双蒸水, 加入 57.1 mL Hac, 200ml 0.5 mol/L EDTA (pH=8.0), 加水定容至 1000ml。
- (2) 琼脂糖凝胶上样缓冲液 (6×loading buffer): 0.09% 溴酚兰, 60% 甘油, 60mmol/L 混匀, 常温保存。
- (3) 溴化乙锭 (EB, 10mg/mL): 100mL 双蒸水中加入 0.1g EB, 搅拌使完全溶解, 置于棕色试剂瓶, 锡箔包裹, 常温避光保存。
- (4) 1% 的琼脂糖: 称 1g 琼脂糖溶于 100ml 1×TBE 溶液, 再加入 10 mL 左右的双蒸水

溶解完全。

2.2.4.3 培养 DH5 α 菌株和制备感受态细胞所用的溶液配制

- (1)500mlLB 培养基: 5g 胰化蛋白胨, 2.5g 酵母提取物, 5g 氯化钠和 7.5g 琼脂粉中加去离子水至 500ml, 调节 PH 值至 7.0, 高压灭菌。
- (2)含氨苄青霉素的 LB 培养基: 在 LB 培养基中以体积比 1 : 1000 的量加入氨苄青霉素。

2.2.5 PCR 扩增引物

PCR 扩增引物参照 Palumbi(1991)等人所用的引物, 扩增的目的片段为 mtDNA 细胞色素氧化酶第一亚基(Cytochrome oxidase I, CO I)序列中间的一段编码区。用于扩增的引物是 CO I -a 和 CO I -f 由上海生工生物技术工程有限公司合成, 引物序列分别为:

CO I -a: 5'AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC3'

CO I -f: 5'CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC3'

2.3 实验方法

2.3.1 样品 DNA 的提取

在本实验中, 我们采用高盐浓度抽提法, 具体操作如下:

- (1)剪取0.5g左右的尾鳍组织, 用双蒸水洗净尾鳍上沾附的酒精, 充分剪碎, 放入1.5ml 离心管中;
- (2)在每个离心管中分别加入 500 μ l 的 HOM buffer 和 10-15 微升的蛋白酶 K, 在 55 $^{\circ}$ C 消化至少 3 小时, 隔 1 小时摇动一次;
- (3)加 500 μ L 氯化钠(4.5 摩尔), 300 μ l 氯仿, 混 20 分钟, 13000rpm 离心 10 分钟;
- (4)转移上清液到新管(大概 850 μ l 左右), 加 595 μ l 无水异丙醇(0.7volume), 混 20 分钟, 在 13000 rpm 下离心 10 分钟, 倒掉上清;
- (5)加 0.5 毫升 75%的乙醇, 在 55 $^{\circ}$ C 消化 5 分钟, 在 13000 rpm 下离心 20 分钟, 倒掉上清;
- (6)干燥: 将试管倒立, 在室温下自然干燥;

- (7)溶解：加入50—100 μ l的TE buffer或者双蒸水中溶解DNA，4 $^{\circ}$ C过夜，第二天检测；
(8)储存：检测完毕，于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2.3.2 样品 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

- (1)制备1.0%琼脂糖凝胶；
(2)吸取2 μ LDNA原液，加入2 μ L左右溴酚蓝上样缓冲液，混匀，加到点样孔，200V 稳压电泳10min；
(3)电泳完毕后，取出凝胶置于凝胶成像系统下用紫外光拍照，判断是否有PCR产物。

2.3.3 扩增体系

10 \times Buffer	5 μ l
10 mmol/L dNTPs	1 μ l
10 mol/L上下游Primers	各2 μ l
5U/ μ L <i>Taq</i> DNA聚合酶	0.4 μ l
50ng/ μ L模板DNA	2 μ l
灭菌去离子水	37.6 μ l
总体积	50 μ l

2.3.4 扩增程序

循环设置：先 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min； 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec， 55 $^{\circ}$ C 退火 30sec， 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min；共 35 个循环，然后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10min，最后 12 $^{\circ}$ C 保持 10min。扩增反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行。反应均设不含 DNA 模板的阴性对照，以防止外源 DNA 污染造成的错误。

2.3.5 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测

用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物，检测时，每个样品取 3ml，以标准分子量做刻度，用凝胶成像系统紫外光拍照，若有亮带表明有扩增产物，若无，调整扩增条件，重新扩增，再检测。

2.3.6 PCR产物的纯化回收

将扩增效果好的PCR产物在1%琼脂糖上以100V恒压电泳40min。然后在紫外凝胶成像系统上将含有扩增DNA的凝胶切入EP管中，并称量凝胶重量，该重量作为一个凝胶体积(如100mg=100 μ l)。加入3个凝胶体积的Buffer DE-A，混合均匀后于75 $^{\circ}$ C加热至凝胶完全融化。再加入0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B，混合均匀。后续使用离心法并按AXYGEN回收试剂盒的说明操作。其中Buffer DE-A是凝胶融化剂，Buffer DE-B是结合液，促使大于70bp的DNA片段选择性结合到DNA制备膜上。

2.3.7 克隆与测序

2.3.7.1 纯化片段与PMD18-T载体连接

按下列反应体系将纯化的PCR产物与PMD18-T载体进行连接：将纯化PCR产物7 μ l，连接酶缓冲液2.5 μ l，PMD18-T载体0.5 μ l置于4 $^{\circ}$ C连接过夜或16 $^{\circ}$ C连接1h。

2.3.7.2 感受态细胞的制备

- (1)用接种环将大肠杆菌DH5 α 菌液划线培养接种在LB固体培养基上，将培养基倒置放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中14-16h。待长出菌株后，挑取一单菌落接种于3-5mlLB液体培养基中，37 $^{\circ}$ C，200rpm培养6h。
- (2)取250 μ l摇好的菌液加入到100ml的LB大锥形瓶中37 $^{\circ}$ C，200rpm培养大约3.5h，使OD值在0.3-0.4之间。
- (3)将大锥形瓶放入冰浴中冷却10min，转入50ml离心管中，于4 $^{\circ}$ C，4000r/min离心10min。
- (4)去掉离心后的上清液，用10ml冰浴的0.1mol/LCaCl₂溶液轻拍离心管底的细胞至分散均匀，置于冰浴30min，然后于4 $^{\circ}$ C，4000r/min离心10min。
- (5)弃去上清液，加入2ml冰冷的0.1mol/LCaCl₂溶液。以100 μ l/管分装于1.5mlEP管中，置于冰浴中，24h内感受态细胞可直接用于转化实验。如果感受态细胞不立即用于转化实验，加入体积比为15%的甘油贮存于-70 $^{\circ}$ C，小心悬浮细胞，一般可保存半年至一年。

2.3.7.3 连接产物的转化

- (1)将感受态细胞和连接产物放入冰水混合物中约15min。
- (2)把连接产物3 μ l加入100 μ l感受态细胞中，在冰水混合物中放置30-40min，混合均匀。
- (3)热激活：42 $^{\circ}$ C水浴90s。
- (4)在冰上放置2-5min，加入到900 μ lLB培养基中，37 $^{\circ}$ C，100rpm培养1h。
- (5)把摇好的菌液在室温下5000rpm离心2min。
- (6)弃上清液大约至100 μ l左右，轻轻吹打沉淀充分吹散，吸取菌液加入含氨苄的平板上，用涂布棒涂布均匀。
- (7)平板正向放置10分钟，待菌液充分渗入培养基后，倒平板放置培养14-16h。

2.3.7.4 挑克隆及测序

用牙签挑取平板上长出的菌落放入EP管中，加入200 μ l的LB液体培养基，在37 $^{\circ}$ C，210rpm培养4h。以此菌液作为DNA模板，在以相同条件进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳时加marker以确定克隆片段的大小，将是阳性克隆的菌液送往联合基因测序。

2.4 数据分析

2.4.1 序列校正

测序所得的序列与原始序列图进行仔细校核后，采用Clustalx1.8进行序列自动对准。然后再采用Dnastar软件(Lasergene version 5.0)包中的Megalign进行排序、比对以验证Clustalx分析结果的正确性，经比对后结果一致的数据用FASTA格式输出，再经格式转换后用MEGA4.0软件进行分子进化分析。

2.4.2 外类群的选择

在现生鱼类当中，多鳍目(Polyteriforms)被认为与鲟形目亲缘关系相对较近(Patterson,1982; Birstein et al.,1997a; Bemis et al.,1997b)。在本实验中以多鳍鱼(*Polypterus ornatipinnis*)为外类群分析 mtCO I 在鲟形目中的进化速率及系统发育关系。外类群的 mtCO I 基因序列来源于 GenBank 数据库。

2.4.3 序列进化分析

对序列进行的分析主要包括如下：

- (1)各序列的碱基组成和碱基之间转换/颠换比率,应用 Kimura's 双参数模型(Kimura, 1980)计算各分类阶元间的遗传距离。为确保结果的可信性,同时采用 Jukes-Cantor 模型(Jukes et al.,1969)进行同样的计算。统计密码子的使用频率情况。该过程使用 Mega 4(Tamura et al.,2007)完成。并通过观察到的转换和颠换数目与遗传距离作图来检验序列的核苷酸替代是否达到饱和。
- (2)用 Nei-Gojobori 进化途径法(Nei et al.,1986)和 Li-Wu-Luo 方法(Li et al.,1985)计算 15 条基因序列之间密码子的非同义突变和同义突变率($\omega=dN/dS$)以确定 mtCO I 的进化模式,并用 DnaSP 3(Rozas et al.,1999)中的 Tajima's D test 和 Fu and Li's D/F test 进行中性检验(Tajima,1989; Fu et al.,1993)以检验进化途径法的结果并可以统计 mtCO I 偏离中性进化的程度。
- (3) 应用 Tajima's 非参数相对速率检验(Tajima,1993)和以多鳍鱼为外类群检验分子钟假设在该段基因上是否成立。如果成立用分子钟公式 $V=K/2T$ (Kimura,1980)计算该段基因的进化速率。其中 K 为鲟科和白鲟科的遗传距离, T 为鲟科和白鲟科的分化时间。

2.5 结果

通过 PCR 扩增,我们共获得 8 种鲟鱼(中华鲟、俄罗斯鲟、纳氏鲟、欧洲鲟、小体鲟、西伯利亚鲟、施氏鲟和达氏鳇)的线粒体细胞氧化色素酶亚基 I 基因序列。8 条序列全部提交 GenBank,序列号为 GQ502670-GQ502677。在本研究分析中,还包括了从 GenBank 上下载的其余 7 种鲟鱼(闪光鲟、高首鲟、长江鲟、欧洲鳇、密苏里铲鲟、匙吻鲟和白鲟)的 mtCO I 基因同源序列和外类群多鳍鱼 mtCO I 基因的同源序列。经 Clustalx1.8 对比之后发现,15 条鲟形目鱼类的 mtCO I 序列长度和外类群该基因片段长度均为 681bp。

2.5.1 序列信息

经过比对(Alignment)后的 15 条序列有保守位点 507 个,变异位点 174 个,简

约信息位点 120 个, 占整个序列的 17.6%。所有序列没有观察到任何碱基的缺失或插入。mtCO I 序列表现出明显的碱基组成偏向性, 即在 A、G、C、T 四种碱基中 G 的含量(19.2%)明显低于其他三种碱基的含量(A、C、T 分别为 24.6%、28.1%、28.1%)。因此 G+C 含量(47.3%)也相应低于 A+T 的含量(52.7%)。就单个密码子而言(表 2.3), 第一位点表现出明显的 G 偏倚性(A、G、C、T 分别为 23.6%、31.9%、21.4%和 23.1%), 第二位点表现出更为明显的 T 偏倚性(A、G、C、T 分别为 18.8%、15.5%、25.4%和 40.2%), 而第三位点 G 碱基的含量特别低, 表现出了 A 和 C 的偏倚性(A、G、C、T 分别为 31.4%、10.1%、37.5%和 20.9%)。因此, 分析基因全部位点的碱基组成和每一个密码子各自的碱基比例情况是不一致的。

表 2.3 十五条序列的碱基组成

Table 2.3 Base composition of mtCO I at first, second and third codon positions of fifteen sequences

Codon position	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)
First	23.6	23.1	31.9	21.4
Second	18.8	40.2	15.5	25.4
Third	31.4	20.9	10.1	37.5
Overall	24.6	28.1	19.2	28.1

从序列的密码子使用频率来看, 编码苯丙氨酸(Phe)的 UUU 和 UUC, 亮氨酸(Leu)的 CUA, 丙氨酸(Ala)的 GCC 和甘氨酸(Gly)的 GGC, 其使用频率都已达到 10%以上, 最高频率为 11.9%。而编码亮氨酸(Leu)的 UUG, 丝氨酸(Ser)的 UCG, 丙氨酸(Ala)的 GCG, 谷氨酰胺(Gln)的 CAG, 天冬酰胺(Asn)的 AAU, 赖氨酸(Lys)的 AAG, 谷氨酸(Glu)的 GAG 和精氨酸(Arg)的 CGU 与 CGC, 其使用频率都在 1%以下, 最低频率为 0.1%。序列中不含半胱氨酸(Cys)的密码子。密码子 AGU、UGU 和 UGC 均未使用到。从 RSCU 值来看, UUC、UUA、CUA、AUU、GUA、UCC、UCA、CCC、CCA、ACC、ACA、GCC、UAC、CAC、CAA、AAC、AAA、GAC、GAA、CGC、CGA、CGG、GGC 和 GGA 的 RSCU 值均大于 1, 为相对偏好密码子。统计情况见表 2.4。

表 2.4 681bp 线粒体 CO I 基因的密码子使用情况
Table 2.4 Codon usage of 681bp of mt CO I

Aminoacid	Codon	Frequency (%)	RFSC	Aminoacid	Codon	Frequency (%)	RFSC	
Phe	UUU	10.0	0.91	Ala	GCU	4.9	1.00	
	UUC	11.9	1.09		GCC	10.9	2.25	
Gly	GGU	3.7	0.57	Tyr	GCA	3.5	0.73	
	GGC	10.3	1.60		GCG	0.1	0.01	
	GGA	9.7	1.50		UAU	5.3	0.82	
Ile	GGG	2.1	0.33	His	UAC	7.7	1.18	
	AUU	9.0	1.22		CAU	3.4	0.52	
Met	AUC	6.9	0.94	Gln	CAC	9.6	1.48	
	AUA	6.3	0.85		CAA	1.8	1.80	
Val	AUG	5.8	1.00	Asn	CAG	0.2	0.20	
	GUU	1.9	0.39		AAU	0.5	0.45	
	GUC	4.6	0.97		AAC	1.6	1.55	
	GUA	8.8	1.85		AAA	4.7	1.89	
Ser	GUG	3.7	0.79	Lys	AAG	0.3	0.11	
	AGC	1.3	0.82		GAU	1.9	0.47	
	UCU	0.5	0.30		Asp	GAC	6.1	1.53
	UCC	3.5	2.29		Glu	GAA	1.3	1.27
	UCA	3.1	1.99			GAG	0.7	0.73
Trp	UCG	0.9	0.60	Arg	CGU	0.1	0.13	
	UGG	1.2	1.0		CGC	0.9	1.87	
	Pro	CCU	2.1		0.75	CGA	1.0	2.00
CCC		4.5	1.64	Leu	CGG	1.0	2.00	
CCA		3.2	1.16		UUA	4.7	1.27	
CCG		1.3	0.46		UUG	0.2	0.05	
Thr	ACU	0.7	0.20		CUU	3.3	0.89	
	ACC	4.9	1.36	CUC	2.5	0.67		
	ACA	7.5	2.06	CUA	10.5	2.87		
	ACG	1.4	0.39	CUG	0.9	0.24		

*RFSC 指相对同义密码子使用频率。RFSC denotes relative frequency synonymous codon

值的注意的是，在脊椎动物的线粒体基因中采用了和核基因略有不同的氨基酸编码系统。脊椎动物线粒体中 UGA 不再是终止密码子，而是编码色氨酸(Trp)。相反，AGA 和 AGG 不再编码精氨酸(Arg)，而是成为终止密码子。在核基因里编码异亮氨酸(Ile)的 AUA，在线粒体里却用来编码甲硫氨酸(Met)(郑用琏,2007)。

经 Mega 4 软件计算成对序列之间的转换 Ts 和颠换 Tv 值表明, 序列总体上存在转换偏倚现象。转换(Transition)发生 47 次, 颠换(Transversion)发生 8 次, 其中 T-C 转换 30 次, A-G 转换 8 次; T-A 颠换 3 次, T-G 颠换 1 次, C-A 颠换 3 次, C-G 颠换 1 次。密码子第一位的转换和颠换的比率 Ts/Tv 为 23.1, 密码子第三位的 Ts/Tv 为 6.0。就单个密码子位点而言, 92.7%的替换发生在密码子第三位上, 7.3%的替换发生在密码子第一位上, 密码子第二位点未观测到任何变异。由 Kimura's two-parameter 模型得到的成对序列之间的遗传距离 K 为 0.0074 到 0.1576, 鲟科 (Acipenseridae)和白鲟科(Polyodontidae)的平均遗传距离为 0.1408。根据得到的遗传距离 K 值和观测到的成对序列之间的转换和颠换数目作图, 发现转换和颠换的数目与遗传距离成线性关系(图 2.1)。同样地经分析, 遗传距离 K 与发生变异最多的密码子第三位碱基的转换和颠换数目亦成线性关系(图 2.2)。良好的线性关系说明, 该段 mtCO I 基因在进化过程中核苷酸的替代还未达到饱和(Saturation), 适合进行分子进化和系统发育研究。

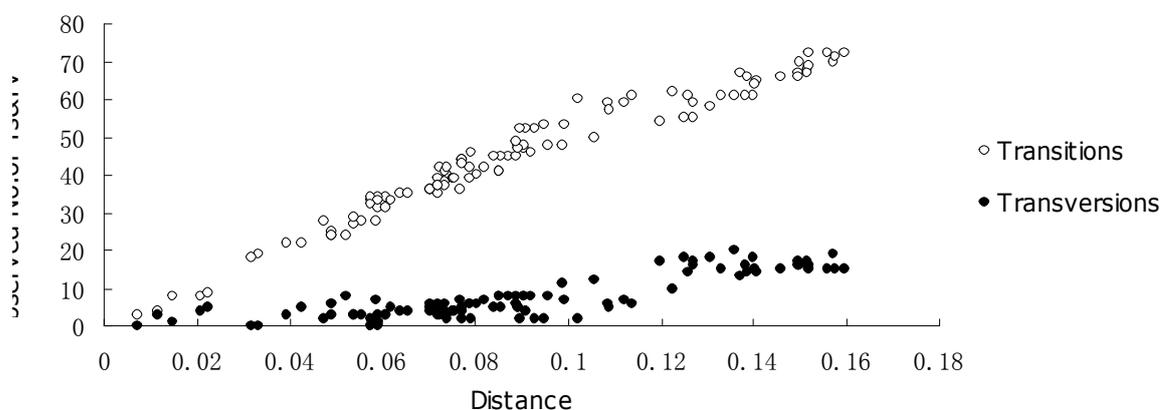


图 2.1 mtCO I 序列转换与颠换数目与遗传距离的关系

Fig. 2.1 Observed numbers of transitions and transversions plotted against kimura-two-parameter distance for mtCO I gene

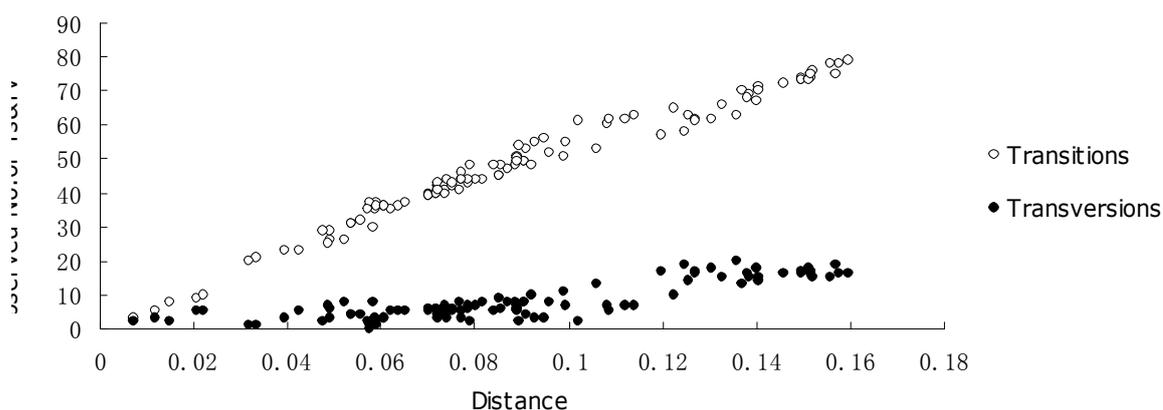


图 2.2 mtCO I 序列密码子第三位点转换与颠换数目与遗传距离的关系
Fig. 2.2 Observed numbers of transitions and transversions at third codon positions plotted against kimura-two-parameter distance for mtCO I gene

2.5.2 mtCO I 基因的进化模式

根据 Nei-Gojobori 法和 Li-Wu-Luo 法进一步估计的密码子的同义替代 (Synonymous, d_s) 和非同义替代 (Nonsynonymous, d_N) 的发生速率显示, 非同义替代的速率远远小于同义替代, 其速率比 (d_N/d_s) 全部小于 1, 平均速率比为 0.0221, 其中 $d_N=0.0095 \pm 0.0025$, $d_s=0.4306 \pm 0.0379$ 。中性检验的结果均小于 0, $P>0.1$ (表 2.5), 表明 mtCO I 的进化历程偏离了中性模式, 但未达到统计学上的显著水平, 负选择 (净化选择) 是该段基因进化的主要的驱动力。

表 2.5 中性检验的结果
Table 2.5 Results of neutral test for natural selection on mtCO I gene

Neutral test	681bp of mtCO I gene	
	Value	P
Tajima's D test	-0.48079	>0.10
Fu and Li's D test	-0.29703	>0.10
Fu and Li's F test	-0.40216	>0.10

2.5.3 相对速率检验及 mtCO I 基因进化速率估算

相对速率检验的结果见表 2.6。其中 A 和 B 代表研究用的 15 种鲟鱼, C 代表外类群, m_i 代表某一条序列的核苷酸组成不同于另外两条序列的核苷酸组成数目, s_i 和 v_i 分别代表不同的核苷酸组成中的碱基转换数目和颠换数目, 1D 和 2D 分别代表两种不同的卡方检验 (Chi-square test, χ^2)。

表 2.6 相对速率检验分子钟假设
Table 2.6 Relative-rate test of molecular clock hypothesis

Species*			No. of different sites			Chi-square	
A	B	C	m ₁ (s ₁ ,v ₁)	m ₂ (s ₂ ,v ₂)	m ₃ (s ₃ ,v ₃)	1D	2D
01	02	16	29(22,7)	19(17,2)	104(60,44)	2.08	3.42
01	03	16	26(20,6)	17(16,1)	107(63,44)	1.88	4.02
01	04	16	25(20,5)	26(23,3)	109(62,47)	1.98	1.98
01	05	16	24(19,5)	17(14,5)	110(63,47)	1.20	1.26
01	06	16	21(16,5)	19(17,2)	111(66,45)	0.10	1.32
01	07	16	29(24,5)	17(16,1)	104(58,46)	3.13	4.27
01	08	16	32(24,8)	20(17,3)	101(57,44)	2.77	3.47
01	09	16	22(20,2)	26(24,2)	106(62,44)	0.33	0.36
01	10	16	29(25,4)	29(25,4)	101(57,44)	0	0
01	11	16	25(21,4)	15(15,0)	106(62,44)	2.50	5.00
01	12	16	26(21,5)	19(17,2)	110(61,49)	1.09	1.71
01	13	16	18(15,3)	14(13,1)	116(68,48)	0.50	1.14
01	14	16	29(22,7)	32(26,6)	96(58,38)	0.15	0.41
01	15	16	35(29,6)	34(28,6)	87(52,35)	0.01	0.02
02	03	16	2(2,0)	3(2,1)	132(76,56)	0.20	1.00
02	04	16	16(16,0)	17(14,3)	108(61,47)	0.03	3.13
02	05	16	15(15,0)	18(15,3)	108(62,46)	0.27	3.00
02	06	16	10(10,0)	18(16,2)	109(67,42)	2.29	3.38
02	07	16	11(11,0)	9(7,2)	118(66,52)	0.20	2.89
02	08	16	5(5,0)	3(2,1)	130(72,58)	0.50	2.29
02	09	16	11(10,1)	25(21,4)	110(66,44)	5.44*	5.70
02	10	16	15(15,0)	25(21,4)	113(62,51)	2.50	5.00
02	11	16	11(11,0)	11(9,2)	116(66,50)	0	2.20
02	12	16	13(13,0)	16(14,2)	114(64,50)	0.31	2.04
02	13	16	12(12,0)	18(15,3)	119(65,44)	1.20	3.33
02	14	16	26(23,3)	39(34,5)	93(52,41)	2.60	2.62
02	15	16	29(25,4)	38(32,6)	90(51,39)	1.21	1.26
03	04	16	17(16,1)	17(14,3)	105(61,44)	0	1.13
03	05	16	16(15,1)	18(15,3)	105(62,43)	0.12	1.00
03	06	16	11(10,1)	18(16,2)	106(67,39)	1.69	1.72
03	07	16	13(12,1)	10(8,2)	114(65,49)	0.39	1.13
03	08	16	6(5,1)	3(2,1)	127(72,55)	1.00	1.29
03	09	16	10(10,0)	23(20,3)	114(68,46)	5.12*	6.33*
03	10	16	18(17,1)	27(23,4)	108(60,48)	1.80	2.70
03	11	16	10(10,0)	9(8,1)	121(69,52)	0.05	1.22
03	12	16	15(14,1)	17(15,2)	120(63,47)	0.13	0.37
03	13	16	10(10,0)	15(13,2)	115(69,46)	1.00	2.39
03	14	16	24(21,3)	36(31,5)	97(55,42)	2.40	2.42
03	15	16	28(24,4)	36(30,6)	93(53,40)	1.00	1.07
04	05	16	1(1,0)	3(2,1)	136(75,61)	1.00	2.00
04	06	16	5(4,1)	12(12,0)	128(71,57)	2.88	5.00
04	07	16	17(16,1)	14(14,0)	105(59,46)	0.29	1.13
04	08	16	18(14,4)	15(14,1)	106(60,46)	0.27	1.80
04	09	16	10(8,2)	23(21,2)	116(66,50)	5.12*	5.83
04	10	16	19(18,1)	28(26,2)	107(57,50)	1.72	1.79
04	11	16	19(17,2)	18(17,1)	102(58,44)	0.03	0.33
04	12	16	13(12,1)	15(15,0)	116(63,53)	0.14	1.33
04	13	16	11(10,1)	16(15,1)	118(65,53)	0.93	1.00
04	14	16	26(21,5)	38(35,3)	85(49,36)	2.25	4.00
04	15	16	31(25,6)	39(34,5)	83(47,36)	0.91	2.07
05	06	16	6(5,1)	11(11,0)	130(72,58)	1.47	3.25
05	07	16	19(18,1)	14(14,0)	105(59,46)	0.76	1.50

							continued
05	08	16	19(15,4)	14(13,1)	108(61,47)	0.76	1.94
05	09	16	12(10,2)	23(21,2)	115(66,49)	3.46	3.90
05	10	16	20(19,1)	27(25,2)	109(58,51)	1.04	1.15
05	11	16	21(19,2)	18(17,1)	102(58,44)	0.23	0.44
05	12	16	15(14,1)	15(15,0)	117(63,54)	0	1.03
05	13	16	12(11,1)	15(14,1)	120(66,54)	0.33	0.36
05	14	16	27(22,5)	37(34,3)	87(50,37)	1.56	3.07
05	15	16	33(27,6)	39(35,4)	84(47,37)	0.50	1.43
06	07	16	20(20,0)	10(10,0)	105(63,42)	3.33	-
06	08	16	21(18,3)	11(10,1)	107(64,43)	3.13	3.29
06	09	16	11(10,1)	17(15,2)	121(72,49)	1.29	1.33
06	10	16	24(24,0)	26(24,2)	108(59,49)	0.08	2.00
06	11	16	21(20,1)	13(12,1)	105(63,42)	1.88	2.00
06	12	16	15(15,0)	10(10,0)	118(68,50)	1.00	-
06	13	16	12(12,0)	10(9,1)	123(71,52)	0.18	1.43
06	14	16	30(26,4)	35(31,4)	90(53,37)	0.38	0.44
06	15	16	35(30,5)	36(31,5)	90(51,39)	0.01	0.02
07	08	16	12(9,3)	12(11,1)	115(63,52)	0	1.20
07	09	16	7(6,1)	23(21,2)	111(66,45)	8.53**	8.67*
07	10	16	18(18,0)	30(28,2)	108(55,53)	3.00	4.17
07	11	16	3(2,1)	5(4,1)	125(72,53)	0.50	0.67
07	12	16	8(8,0)	13(13,0)	117(65,52)	1.19	-
07	13	16	11(11,0)	19(18,1)	108(62,46)	2.13	2.69
07	14	16	23(19,4)	28(32,6)	93(52,41)	3.69	3.71
07	15	16	29(24,5)	40(34,6)	85(48,37)	1.75	1.82
08	09	16	13(11,2)	29(23,6)	116(63,43)	6.10*	6.24*
08	10	16	18(17,1)	30(25,5)	109(57,52)	3.00	4.19
08	11	16	13(12,1)	15(12,3)	112(62,50)	0.14	1.00
08	12	16	14(13,1)	19(16,3)	112(61,51)	0.76	1.31
08	13	16	13(12,1)	21(17,4)	117(62,45)	1.88	2.66
08	14	16	25(21,4)	40(36,4)	91(49,42)	3.46	3.95
08	15	16	29(24,5)	40(35,5)	87(47,40)	1.75	2.05
09	10	16	30(28,2)	26(23,3)	107(59,48)	0.29	0.69
09	11	16	19(17,2)	5(5,0)	121(71,50)	8.17**	8.55*
09	12	16	23(21,2)	12(11,1)	115(66,49)	3.46	3.46
09	13	16	19(18,1)	11(11,0)	124(70,54)	2.13	2.69
09	14	16	30(25,5)	29(23,6)	103(60,43)	0.02	0.17
09	15	16	38(32,6)	33(26,7)	93(55,38)	0.35	0.70
10	11	16	31(28,3)	21(20,1)	106(55,51)	1.92	2.33
10	12	16	29(27,2)	22(22,0)	113(56,57)	0.96	2.51
10	13	16	29(27,2)	25(24,1)	105(56,49)	0.30	0.51
10	14	16	33(28,5)	36(33,3)	92(51,41)	0.13	0.91
10	15	16	38(32,6)	37(33,4)	91(49,42)	0.01	0.42
11	12	16	12(11,1)	15(14,1)	112(64,48)	0.33	0.36
11	13	16	10(10,0)	16(15,1)	116(67,49)	1.38	2.00
11	14	16	23(20,3)	36(30,16)	99(54,45)	2.86	3.00
11	15	16	30(25,5)	39(32,7)	91(50,41)	1.17	1.19
12	13	16	13(13,0)	16(15,1)	117(65,52)	0.31	1.14
12	14	16	25(21,4)	35(30,5)	97(54,43)	1.67	1.70
12	15	16	31(26,5)	37(31,6)	92(51,41)	0.53	0.53
13	14	16	26(22,4)	33(29,4)	98(55,43)	0.83	0.96
13	15	16	30(25,5)	33(29,4)	92(53,39)	0.14	0.41
14	15	16	29(27,2)	25(22,3)	106(61,45)	0.30	0.71

Note: 01-15 分别代表 密苏里铲鲟 *S.albus*、西伯利亚鲟 *A.baerii*、长江鲟 *A.dabryanus*、俄罗斯鲟 *A.gueldenstaedtii*、纳氏鲟 *A.naccarii*、小体鲟 *A.ruthenus*、施氏鲟 *A.schrenckii*、中华鲟 *A.sinensis*、闪光鲟 *A.stellatus*、欧洲鲟 *A.sturio*、高首鲟 *A.transmontanus*、鳊 *H.dauricus*、欧洲鳊 *H.huso*、匙吻鲟 *P.spathula* 和白鲟 *P.gladus*

*差异显著性在 5%水平; **差异显著性在 1% 水平

- 2D 检验不能在这些物种上进行

相对速率检验的结果显示, 当以多鳍鱼(*Polypterus ornatipinnis*)作为外群时, 所研究的鲟形目鱼类除闪光鲟(*Acipenser stellatus*)的进化速率稍有不协调外, 其他鲟鱼的进化速率保持相对一致。基于上述, 分子钟假设在鲟形目的 mtCO I 基因中应该是成立的, 根据鲟科(Acipenseridae)和白鲟科(Polyodontidae)的平均遗传距离为 0.1408 和分歧时间在 114.1-145.2Mya 之间(Inoue et al.,2005), 应用分子钟公式 $V=K/2T$ 估算 mtCO I 基因的进化速率为 0.048-0.062 subs/site year⁻¹10⁻⁹.

2.6 讨论

2.6.1 mtCO I 基因序列特点

2.6.1.1 序列碱基替换特征

基因序列的碱基替换是进化的重要方式。在已测得的 681bp 的线粒体 CO I 基因序列中, 转换发生的频率远远大于颠换发生的频率, 这与线粒体基因组进化的转换偏倚特性相符合((Brown et al.,1982; Wakeley,1996)。观察到在氨基酸密码子的第一、二、三位的碱基替换中, 第三位碱基发生的替换数显著高于前两个位点, 这与第三位碱基承担着较小的进化压力和发生同义突变的比率较大有关。同时第三位碱基高的替换率也说明该基因片段是我们的目的片段而非核假基因 (nuclear pseudogene)(Bensasson et al.,2001)。

转换颠换比 (Ts/Tv) 是序列进化的一个重要参数。在线粒体基因组中, 转换在数量上通常超过颠换 10-20 倍, 而且随着进化时间的增加和颠换的累积, 转换偏倚会下降, Ts/Tv 的临界值为 2.0(黄原,1998)。在本实验中, Ts/Tv 发生在密码子第一位和第三位, 且值远大于 2.0, 并且与 Kimura's two-parameter 遗传距离呈良好的线性关系, 说明遗传距离和转换颠换之间表现出相应的依赖性, 表明鲟形目线粒体该段基因序列的碱基替换未达到饱和, 适合用于分子进化的方面的研究。

2.6.1.2 密码子偏倚

DNA 所携带的遗传信息经过转录后被转移到 mRNA, mRNA 上的核苷酸以 3 个为一体, 即三联体密码子进行翻译。可以看到对于四个不同的核苷酸 A、T(U)、C 和 G 而言, 共有 $4^3=64$ 种可能的密码子。除了三钟起始密码子以外, 余下的 61 个密码子编码 20 种氨基酸, 所以许多氨基酸的密码子不止一个。同一种氨基酸有两个或更多密码子的现象称为密码子的简并性(degeneracy)。对应于同一种氨基酸的不同密码子称为同义密码子(synonymous codon), 编码不同氨基酸的密码子称为非同义密码子(nonsynonymous codon)。实际上, 编码同一个氨基酸的不同同义密码子有不同的出现频率, 某些密码子具有较高的出现频率, 这种现象称为密码子使用偏倚。导致密码子使用偏倚主要是由生物体的个性所决定的(王镜岩等,2002)。例如嗜热菌的基因组具有较高的 GC 含量, 因此偏爱包含鸟嘌呤和胞嘧啶的密码子。同理编码这种同工受体的基因的拷贝数也相应较多(郑用琏,2007)。通过密码子使用偏好性的研究(1)可以判定一些最优先密码子, 针对这些密码子设计基因工程表达载体, 可以提高目的基因的表达量(张雅丽等,2002); (2)通过比较核基因编码的核糖体蛋白和线粒体基因编码的核糖体蛋白上密码子使用频率的不同来预测未知蛋白所处的基因组位置; (3)利用密码子使用偏好性和某种功能的关联程度对未知功能基因进行预测。

常用相对同义密码子使用频率(relative frequency of synonymous codon,RFSC)来对密码子使用偏倚进行测度。RFSC 反映的是样本中各个同义密码子的使用频率, 计算式为某一密码子在样本中的实际观察数与该密码子对应的氨基酸在样本中的实际观察数的比值(胡桂兵等,2006; 周猛等,2007)。本研究中采用密码子使用频率和相对同义密码子使用频率一起来表示密码子使用的情况。从线粒体 CO I 基因的密码子使用情况来看, 各个密码子的使用频率和 RFSC 结果并不成正比例关系, 用 RFSC 来表示密码子使用偏倚程度更具有可比性。以 RFSC 值大于 1%为标准, 在 mt CO I 基因序列中发现了 24 个偏好性密码子。而编码丝氨酸的密码子 AGU 的出现概率为零。

2.6.2 mtCO I 基因进化模式

分子进化研究中有效检测进化模式的统计学方法是比较核苷酸序列上密码子的非同义替换(aminoacid changing, d_N)和同义替换(silent, d_S)的速率(Yang,2000b; Nielsen,

2005)。当 dN/dS 比率(ω)大于 1, 证明蛋白质受到有益的氨基酸替换, 表现为正选择作用, 反之, 说明非同义替换是有害的, 负选择将降低其固定速率。正选择能够赋予蛋白质新的结构和功能, 有利于个体的生存和繁殖, 该位点的氨基酸替代速率很高。负选择位点对于维持蛋白质的正常结构具有关键作用, 很难在被替代的情况下维持正常功能, 该位点的氨基酸替代速率很低。正、负选择位点的检测和识别对于理解蛋白质的结构和功能具有重要意义(张原等,2003)。在我们的研究中, 根据 Nei-Gojobori 法和 Li-Wu-Luo 法估算的结果, 非同义替代的速率都远远小于同义替代得速率。Tajima's D 和 Fu and Li's D/F 检验也同样证明了 mtCO I 的进化历程偏离了中性模式, 但未达到统计学上的显著水平($P>0.1$), 表现为负选择作用。线粒体基因的这种偏离中性进化方式而表现出负选择的进化方式在其他学者的研究中也普遍得到证实(Meiklejohn et al,2007; Bazin et al.,2006)。

2.6.3 mtCO I 基因的分子钟检验和进化速率估算

分子钟假设 (molecular clock hypothesis) 的概念可以在形态或是生活史上差别较大的物种之间验证蛋白质进化速率的异同 (Kumar,2005)。当物种的序列之间在进化上达到相同或相近的进化速率时, 在此基础上构建的系统发育树才具有实际的科学分析价值。在本研究中我们应用相对速率检验(relative rate test)检测不同物种之间核苷酸置换速率的差异显著性。以多鳍鱼(*Polypterus ornatipinnis*)为外群, 从检验结果表 2.6 可以看出闪光鲟(*Acipenser stellatus*)分别与西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)、长江鲟(*Acipenser dabryanus*)、俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)、施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、小体鲟(*Acipenser ruthenus*)和高首鲟(*Acipenser transmontanus*)的核苷酸置换速率存在差异, 其余 14 种鲟之间未见速率差异。说明在历史进化过程中闪光鲟所承受的自然选择压力导致碱基的替换速率与另外 6 种鲟鱼不同。但是从大范围看来分子钟假设在所研究的鲟形目鱼类当中应该是成立的。因此应用分子钟公式估算出线粒体 CO I 的进化速率应为 $0.048-0.062 \text{ subs/site year}^{-1}10^{-9}$ 。

我们的研究结果表明鲟形目鱼类线粒体该段基因的进化速率比起线粒体基因的平均碱基替换速率 $0.02 \text{ subs/site year}^{-1}10^{-7}$ 要小的多 (Brown et al.,1979)。Krieger 在利用 21 个编码蛋白和 rRNA 的基因比较鲟鱼和硬骨鱼类的进化速率时也验证了鲟鱼低的分子进化速率 (Krieger et al.,2002b)。进化速率上偏慢的特征在龟类和鲨鱼上也同

样成立(Avise et al.,1992; Martin et al,1992), 推测可能与这些物种相似的生活史有关, 例如都具有较大的体型, 较长的世代时间和低的新陈代谢率等。

第三章 通过细胞色素氧化酶亚基 I 序列研究鲟形目鱼类的系统发育

3.1 前言

在对脊椎动物线粒体 DNA 上的 13 个蛋白质编码基因统计分析结果(Zardoya et al.,1996; Russo et al.,1996)表明:在不考虑数据处理和加权的情况下,根据其对已知系统发育关系重建的准确性可以将这些基因大致分为三类:好(CO I,ND4,ND5 和 Cyt b);中等(ND6,ATP6,ND2,CO II 和 COIII);差(ND3,ND4L,ATP8 和 ND1)。通过对不同序列的研究,可以对形态分类不能解决的类群的系统关系进行分析和探讨,也可以对传统的分类系统进行验证,其中 CO I、CO II、Cytb、12SrRNA 和 16SrRNA 的应用最多。一般来说,12SrRNA 和 16SrRNA 比较适合研究属间、不同种间以及分化时间较早的种间的系统关系。CO I、CO II、ND1、ND5 则经常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的亲缘关系(王备新等,2002)。

由于鲟形目鱼类是一种原始古老的鱼类,研究其系统发育对于理解整个脊椎动物的进化都具有相当重要的意义。尽管已经积累了一些形态学、细胞遗传学和分子生物学等方面的参考资料,但距彻底解决鲟形目鱼类的系统发育问题还有一段较长的距离。在分子生物学研究方面,学者们对线粒体基因和核基因都做了部分研究,但是始终没有一个统一的定论。由于线粒体基因较核基因具有明显的研究优势,在综合分析了前人研究的成果和线粒体各基因的特点之后,本章以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因为研究材料,探讨其用于鲟形目鱼类系统发育研究的可行性,同时为其系统进化提供新的线索以供参考。

3.2 实验材料(同第二章)

3.3 实验方法(同第二章)

3.4 数据分析

前期校正工作同第二章,经 Clustalx 比对后的序列用 Nexus 格式输出,以“.nex”为后缀名保存文件,使用 PUAP*4.0b10(Swofford,2002)软件打开该文件,分别键入相应命令用以构建 NJ,MP 和 ML 系统发育树。在简约法中采用启发式搜索(heuristic

search)方法。同时,经比对后的序列用 Fasta 格式输出,以“.fas”为后缀名保存文件,再使用 MEGA4.0 软件打开该文件,构建 MP 和 NJ 系统发育树,以验证两种分析软件的相符程度。在邻接法分析中,遗传距离采用 Kimura's two-parameter 算法。对于 NJ 和 MP 树,均通过 Bootstrap 方法估计支持率,自举值均设为 1000 次。

Bayesian 系统树采用 MrBayesV3.1(Huelsenbeck et al.,2003)软件构建,分析中采用马尔可夫链蒙特卡罗(Markov chain Monte Carlo,MCMC)算法,以随机树为起始树,运行进行 1200000 代,取样频率为 1000,并将开始的 300 个样本作为老化样本(burnin sample)舍弃。

3.4.1 外类群的选择(同第二章)

3.4.2 遗传差异分析

应用 MEGA4.0 软件完成 15 种鲟形目鱼类的遗传差异度和遗传相似度的分析。

3.4.3 系统发育分析

第二章的研究结果表明,线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因序列的碱基替代没有饱和,且相对速率检验证明分子钟假设成立。因此以多鳍鱼(*Polypterus ornatipinnis*)为外群,利用该段基因序列研究 15 种鲟形目鱼类的系统发育关系具有较高的可信度。并以期分析鲟科与白鲟科的分类关系,鲟属、鳊属和铲鲟属的分类关系,鲟科鱼类的单源性问题及发现姐妹亲缘关系种等。

3.5 结果

3.5.1 遗传差异度和相似度

15 种鲟鱼类除白鲟科 (Polyodontidae) 的两种 (匙吻鲟和白鲟) 与鲟科 (Acipenseridae) 的其他种类的差异较大,达到 12.0%-16.0%外,还可见另外一些遗传差异度达到 10%以上的物种。包括密苏里铲鲟与中华鲟、闪光鲟和欧洲鲟;欧洲鲟与小体鲟、闪光鲟和欧洲鳊。差异最小的是俄罗斯鲟和纳氏鲟为 0.7%。两种鳊属 (*Huso*) 鱼类与其他鲟属 (*Acipenser*) 鱼类的差异介于鲟科种类之间,未见有明显差异。

同一科内种间差异最大的是来源于不同属的两种白鲟科鱼类白鲟和匙吻鲟，种间(或称属间)差异达 11.2%。15 种鲟形目鱼类的遗传差异度和遗传相似度见表 3.1。

表 3.1 15 种鲟形目鱼类 mt CO I 序列的遗传差异度%(对角线以下)和遗传相似度%(对角线以上)
Tab 3.1 Genetic distance(below diagonal) and similarity(above diagonal) of 15 species of Acipenseriformes based on alignment of mt CO I nucleotide sequences

种类	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A 密苏里铲鲟		90.9	91.6	92.1	92.1	91.9	91.2	90.3	90.2	89.0	91.8	91.8	93.4	87.8	86.2
B 西伯利亚鲟	9.9		98.8	93.2	93.1	93.2	95.9	98.5	92.4	92.8	95.3	94.3	93.2	87.8	87.5
C 长江鲟	9.1	1.2		92.7	92.5	92.7	95.0	97.9	93.1	91.6	96.2	93.4	94.4	88.7	88.1
D 俄罗斯鲟	8.5	7.2	7.9		99.3	96.8	93.1	93.1	93.4	91.3	92.1	94.6	94.7	86.6	86.2
E 纳氏鲟	8.5	7.4	8.0	0.7		96.9	92.8	93.2	93.0	91.5	91.8	94.4	94.9	86.8	86.0
F 小体鲟	8.7	7.2	7.9	3.3	3.2		92.7	92.8	94.0	90.7	92.2	94.6	95.3	86.8	86.6
G 施氏鲟	9.6	4.3	5.2	7.4	7.7	7.9		95.3	93.1	91.6	97.8	95.4	93.2	88.3	86.8
H 中华鲟	10.6	1.5	2.1	7.4	7.2	7.7	4.9		91.5	91.8	94.4	93.8	92.8	87.7	87.1
I 闪光鲟	10.8	8.2	7.4	7.0	7.5	6.4	7.4	9.2		89.7	94.9	93.0	94.4	88.7	86.6
J 欧洲鲟	12.3	7.7	9.1	9.5	9.3	10.2	9.1	8.9	11.4		90.9	91.8	90.2	86.6	86.3
K 高首鲟	8.9	4.9	4.0	8.6	8.9	8.4	2.2	5.9	5.4	9.9		94.1	94.6	89.1	87.5
L 鳊	8.9	6.1	7.0	5.7	5.9	5.8	4.8	6.5	7.5	9.0	6.2		94.3	88.5	87.5
M 欧洲鳊	7.0	7.2	5.9	5.6	5.4	4.9	7.2	7.7	5.9	10.9	5.7	6.1		88.5	88.7
N 匙吻鲟	13.6	13.7	12.6	15.2	15.0	15.0	13.1	13.8	12.5	15.2	12.0	12.7	12.7		89.9
O 白鲟	15.7	14.1	13.3	15.8	16.0	15.2	15.0	14.6	15.1	15.6	14.0	14.0	13.8	11.2	

3.5.2 系统发育重建

3.5.2.1 MEGA4.0 的分析结果

以 681bp 的细胞色素氧化酶亚基 I 基因序列为材料，采用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)获得的分子树的拓扑结构是一致的，只有各节点的自举置信水平值存在非常小的差异，如图 3.1。

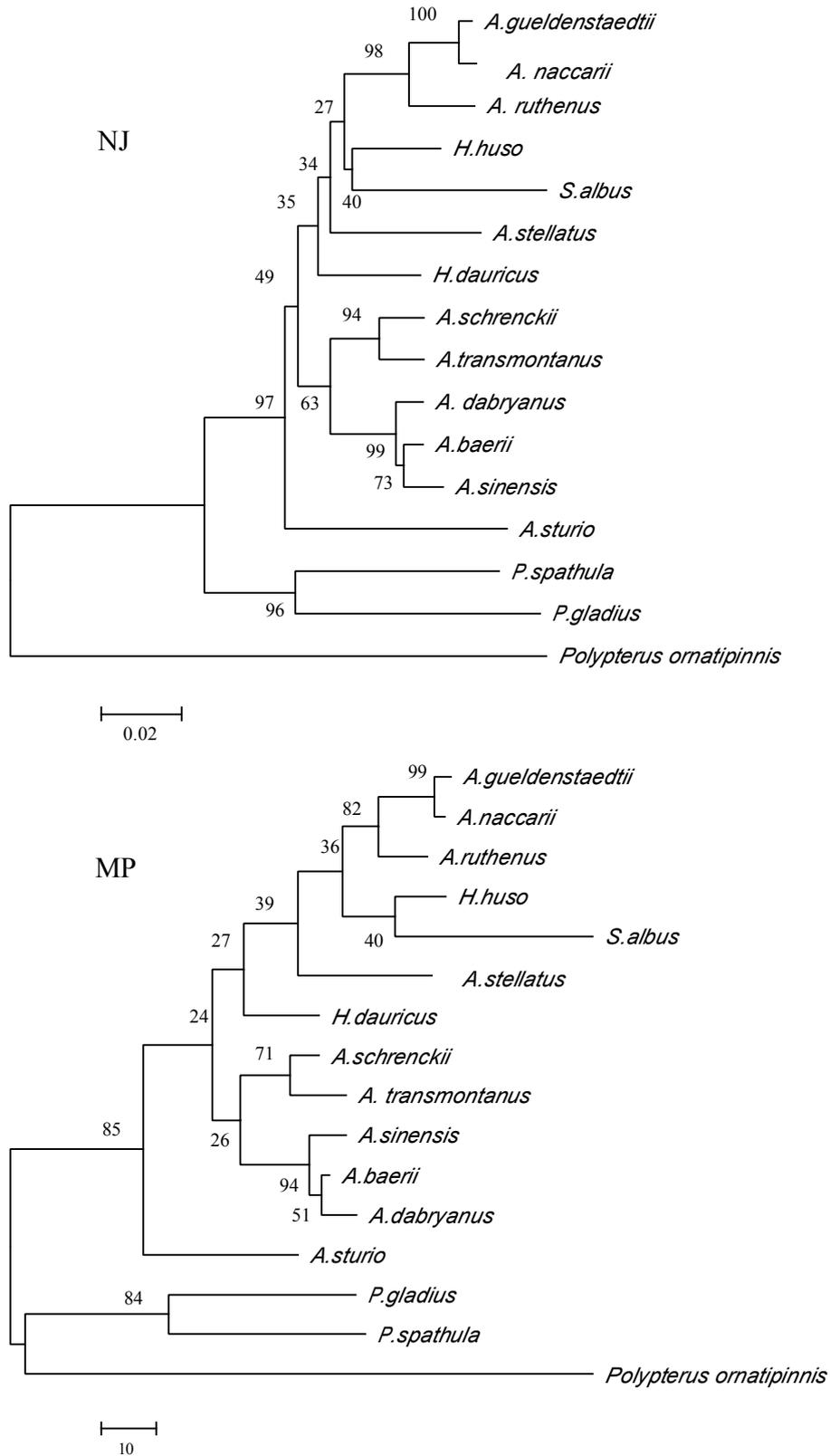
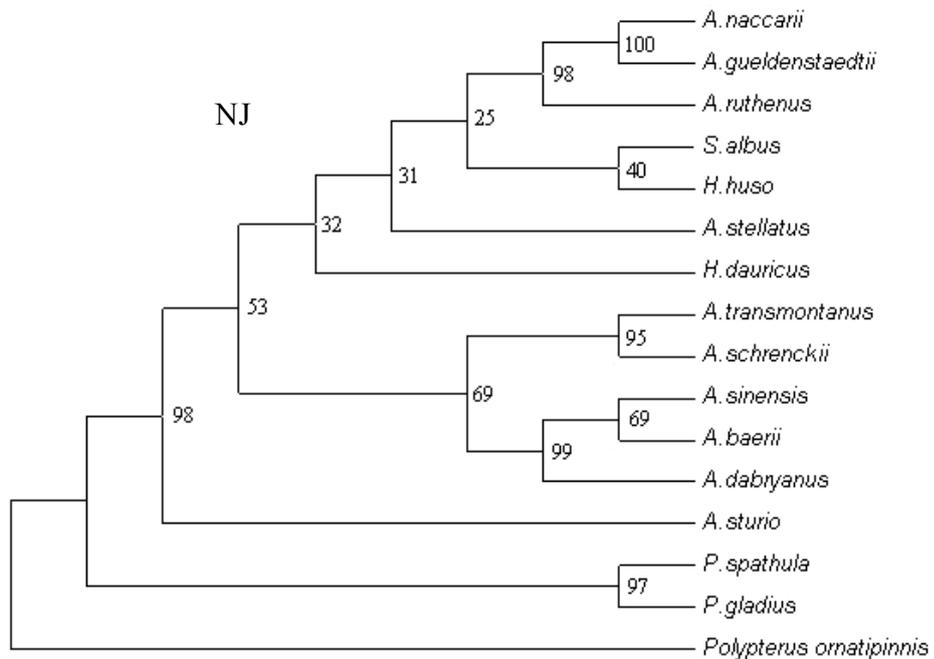


图 3.1 在 MEGA4.0 采用邻接法 NJ 和最大简约法 MP 构建的 15 种鲟形目鱼类的系统发育树
Fig. 3.1 Phylogenetic tree based on partial region of mtCO I gene created using the neighbor-joining and maximum parsimony method by MEGA4.0. Numbers indicate the bootstrap values for 1000 replications.

3.5.2.2 PUAP*4.0b10 的分析结果

以 681bp 的细胞色素氧化酶亚基 I 基因序列为材料,采用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)得到的分子树的拓扑结构一致,只是各节点的置信水平存在微小差异,且与 MEGA4.0 分析得到的结果大致一致。最大简约树的步长为 478,一致系数(CI)和维持性指数(RI)值分别为 0.5879 和 0.5025。见图 3.2。而采用最大似然法(ML)得到的系统发育树与前两种方法得到的结果存在差异,主要表现在欧洲鲟(*Acipenser sturio*)所处的位置上,以及高首鲟(*Acipenser transmontanus*)和施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)的归属问题上。见图 3.3。



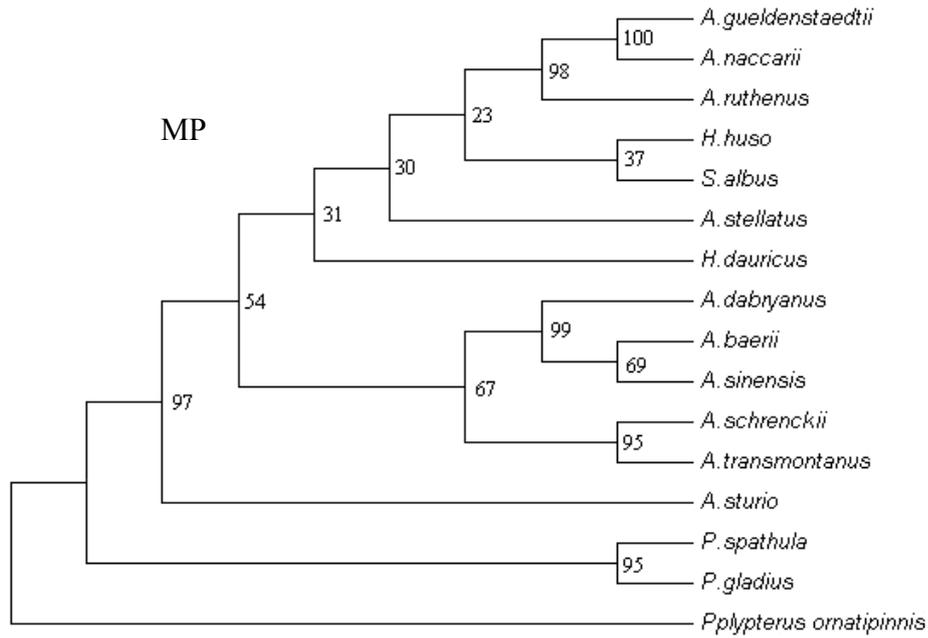


图 3.2 在 PUAP*4.0b10 软件采用邻接法 NJ 和最大简约法 MP 构建的 15 种鲟形目鱼类的系统发育树

Fig. 3.2 Phylogenetic tree based on partial region of mtCO I gene created using the neighbor-joining and maximum parsimony method by PUAP*4.0b10. Numbers indicate the bootstrap values for 1000 replications.

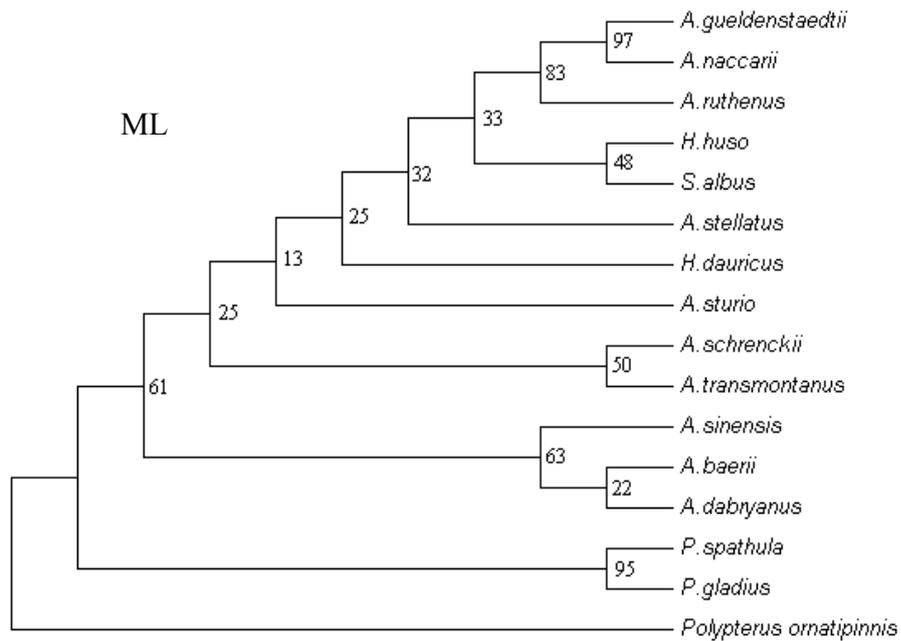


图 3.3 在 PUAP*4.0b10 软件采用最大似然法 ML 构建的 15 种鲟形目鱼类的系统发育树

Fig. 3.3 Phylogenetic tree based on partial region of mtCO I gene created using maximum likelihood method by PUAP*4.0b10. Numbers indicate the bootstrap values for 100 replications

3.5.2.3 MrBayesV3.1 的分析结果

应用贝斯推论的MCMC算法得到的系统发育树和最大似然法ML得到的结果相似，与NJ和MP结果的不同之处同样表现在有关欧洲鲟(*Acipenser sturio*)所处的位置上，以及高首鲟(*Acipenser transmontanus*)和施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)的归属问题上。Bayes树各节点的数值为后验概率(posterior probabilities)。见图3.4。

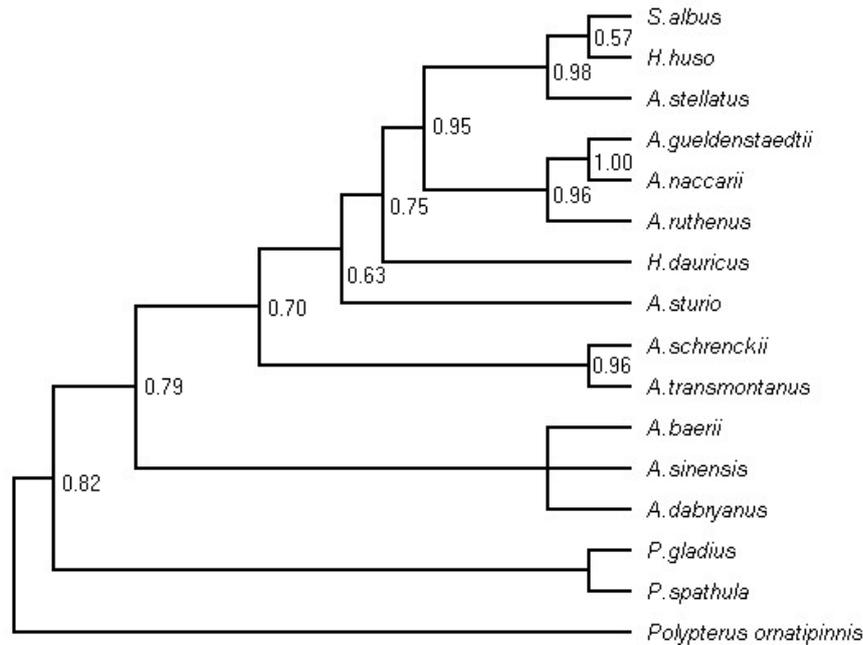


图 3.4 采用贝斯推论构建的 15 种鲟形目鱼类的系统发育树

Fig. 3.4 Phylogenetic tree based on partial region of mtCO I gene created using Bayesian inference. Numbers on Bayesian tree mean posterior probabilities.

研究得到的 15 种鲟鱼的遗传差异度和相似度与构建的系统发育树所表达的遗传距离远近相互吻合。构建的 4 种系统发育树一致证明白鲟科(Polyodontidae)属于单系起源。系统发育关系也显示出并不是所有的鲟科鱼类都聚到了一起，因此不能支持鲟科(Acipenseridae)里的鲟属(*Acipenser*)为单系。对于鳊属(*Huso*)下面现存的欧洲鳊(*Huso huso*)和达氏鳊(*Huso dauricus*)两种，也并没有独立成为一个分类单元，而是包含在了鲟属鱼类当中。上述研究结果和前人的结论全部一致。

我们的研究结果同时支持了以下种类为姐妹种的假设：(1)俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedtii*)和纳氏鲟(*A. naccarii*)作为一类群和小体鲟(*A. ruthenus*)成为姐妹种。通常俄罗斯鲟在形态上和纳氏鲟较为相近，而且这三个种都被看作是大西洋种(Ludwig et al.,2000)；(2)施氏鲟(*A. schrenckii*)和高首鲟(*A. transmontanus*)。另有一些研

究达成共识认为高首鲟, 施氏鲟和中吻鲟(*A. medirostris*)是非常相近的物种(Birstein et al.,1998; Birstein et al.,2002; Artyukhin,2006); (3) 中华鲟 (*A. sinensis*) 和长江鲟 (*A. dabryanus*), 很多研究都认为长江鲟是中华鲟的陆封种(张四明等,1999; Peng et al., 2007; Krieger et al.,2008)。这两个物种与西伯利亚鲟(*A. baerii*)的亲缘关系也相对较近。

对于欧洲鲟(*Acipenser sturio*)在系统树所处的位置, NJ 和 MP 分析结果支持了该物种作为独立的进化枝处于整个鲟科鱼类进化的基础位置, 且支持率均达到了 85% 以上, 说明该物种是鲟属(*Acipenser*)里分化最早种类, 这个结论和 Birstein 和 Artyukhin 的研究结果一致(Birstein et al.,1998; Artyukhin,2006)。而 ML 和 Bayes 的分析结果却表明, 虽然欧洲鲟(*A. sturio*)作为独立的进化枝, 但是分化的历程却靠后了。支持率仅 Bayes 达到 50%以上, ML 的很低只有 13%。在 Krieger 和 Birstein 的研究中, 他们认为铲鲟属 (*Scaphirhynchus*)应该处于整个鲟科鱼类进化的基础位(Krieger et al., 2000; Birstein et al.,2002), ML 法和 Bayes 法得到结果同样未能支持这一结论。因此在我们的研究中, 认为 NJ 和 MP 的分析结果具有较高的可信度, 即欧洲鲟 (*Acipenser sturio*) 作为独立的进化枝并应处于整个鲟科鱼类进化的早期阶段。

Ludwig 根据对线粒体 cyt b 序列的研究(Ludwig et al.,2000), 将鲟鱼分为大西洋 (Atlantic) 种群, 包括西伯利亚鲟 (*A. baerii*)、短吻鲟 (*A. brevirostrum*)、湖鲟 (*A. fulvescens*)、裸腹鲟 (*A. nudiventris*)、俄罗斯鲟 (*A. gueldenstaedtii*)、纳氏鲟 (*A. naccarii*)、波斯鲟(*A. persicus*)、小体鲟(*A. ruthenus*)、闪光鲟(*A. stellatus*)、欧洲鳊 (*H. huso*), 和太平洋(Pacific)种群, 包括中吻鲟(*A. medirostris*)、库页岛鲟(*A. mikadoi*)、施氏鲟(*A. schrenckii*)、中华鲟(*A. sinensis*)、高首鲟(*A. transmontanus*)、鳊(*H. dauricus*)、长江鲟(*A. dabryanus*)。在 NJ 法和 MP 法的分析结果中, 除了鳊(*H. dauricus*)和西伯利亚鲟(*A. baerii*)有例外之外, 所有的这 11 种鲟科鱼类可以分成大西洋种群和太平洋种群。而在 ML 法和 Bayes 法的分析结果中, 并没有将上述鲟鱼归属到不同的地理范围内。主要表现在施氏鲟(*A. schrenckii*)和高首鲟(*A. transmontanus*)并没有与长江鲟 (*A. dabryanus*)、中华鲟(*A. sinensis*)聚在一起。分析其原因主要是因为各种算法依据的模型不同, 导致在分析时出现误差。因此对于各种算法得出的结果, 我们应该综合分析评价, 找出相对最佳的结果。

在本研究中, 我们相对支持 NJ 和 MP 的结果。

3.6 讨论

本文基于 mt CO I 基因构建的 MP、NJ 树均显示,在不考虑两种白鲟科鱼类的前提下,欧洲鲟作为独立的进化枝位于系统树的基部。除了西伯利亚鲟和鳊存在偏差外,其余 10 种鲟鱼分为两大支,欧洲鳊和鳊并没有聚合成一支,而是位于其中一支的内部。两种鳊鱼之间的遗传相似度有时甚至低于它们与鲟属鱼类的遗传相似度。因此,取消鳊属并把鳊属种类归到鲟属是有道理的。从遗传差异度来看,白鲟科两属间遗传差异达 11.2%,而在 13 种鲟科鱼类中欧洲鲟分别与密苏里铲鲟、闪光鲟的遗传差异超过这一值。提示除密苏里铲鲟(*S.albus*)外,12 种鲟鱼在同一进化尺度下可能达到了属间分化水平。这与 Findeis 在鲟属中没有找到包含所有骨骼形态方面的共有特征相符合(Findeis,1997)。基于此,对于鲟属是否可以再细分也是值得再探讨的问题。

本研究首次将线粒体细胞色素亚基 I 基因序列用于鲟形目鱼类的系统进化分析,从得到的结果看来,NJ 和 MP 分子系统树吻合度较好,并支持了前人的研究和假设。说明 mt CO I 基因是一类非常适合鲟形目鱼类系统发育研究的基因,在以后的研究中,希望能找到合适的引物扩增出 mt CO I 的全序列用于分析。

参考文献

1. 常青, 周开亚. 分子进化研究中系统发生树的重建. 生物多样性, 1998, 6: 55-62
2. 陈细华. 鲟形目鱼类生物学与资源现状. 北京: 海洋出版社, 2007
3. 陈姝君, 赫崇波, 木云雷等. 硬骨鱼类线粒体基因系统发育信息效率分析. 中国水产科学, 2008, 15: 12-21
4. 郭新红, 刘少军, 刘巧等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报, 2004, 31: 983-1000
5. 郭晓华, 孙娜, 张媛. 线粒体 CO I 基因在昆虫分子系统学研究中的应用. 国际遗传学杂志. 2009, 32: 79-81
6. 胡桂兵, 张上隆, 徐昌杰等. 柑橘密码子用法分析. 果树学报, 2006, 23: 479-485
7. 黄原. 分子系统学—原理、方法及应用. 北京: 中国农业出版社, 1998
8. 林栲, 李海鹏. DNA 水平上检验正选择方法的研究进展. 遗传. 2009, 31: 896-902
9. 刘培生. 适应性进化与物种形成. 化石. 1995, 2: 19-21
10. 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍. 分子进化与系统发育 (Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. 2000, Oxford University Press). 2002, 北京: 高等教育出版社
11. 吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态性研究和应用进展. 中国水产科学, 1998, 5: 94-103
12. 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学组. 鱼类分类学. 北京, 中国农业出版社, 1995
13. 潘宝平, 卜文俊. 线粒体基因组的遗传与进化研究进展. 生物学通报, 2005, 40: 1-3
14. 石振广, 王云山, 李文龙等. 我国鲟类资源状况及保护利用. 上海水产大学学报, 2002, 11: 317-323
15. 陶敏, 樊棠怀, 徐立中, 胡成钰. 趋化因子及其受体家族分子适应性进化分析. 遗传. 2007, 29: 1519-1524
16. 唐先华, 黄德世, 张晓艳等. 相对速率检验方法与实用程序. 武汉植物学研究. 1999, 17: 353-356
17. 唐先华, 赖旭龙, 钟扬等. 分子钟假说与化石记录. 地学前缘. 2002, 9: 465-474
18. 王备新, 杨莲芳. 线粒体 DNA 序列特点与昆虫系统学研究. 昆虫知识, 2002, 39: 88-92
19. 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 2002

20. 危起伟.中华鲟繁殖行为生态学与资源评估.[博士学位论文].武汉:中国科学院水生生物研究所,2003
21. 王云山. 我国鲟鱼业现状与可持续发展问题的探讨. 黑龙江水产,2007,1:35-37
22. 夏德全,王文君. 动物线粒体 DNA 研究及在鱼类种群遗传结构研究中的应用. 水产学报. 1998, 22:364-370
23. 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报,2000,24:384-391
24. 杨子恒. 计算分子进化. 上海: 复旦大学出版社, 2008
25. 张辉. 中华鲟自然繁殖的非生物环境.[博士学位论文].武汉:华中农业大学,2009
26. 张四明,晏勇,邓怀等. 几种鲟鱼基因组大小、倍性的特征及鲟形目细胞进化的探讨. 动物学报, 1999, 45:200-206
27. 张四明,张亚平,郑向忠等. 12 种鲟形目鱼类 mtDNA ND4L-ND4 基因的序列变异及其分子系统学. 中国科学 C 辑.1999, 29:607-614
28. 张文娟,张原,钟扬. 应用最大似然法检测丙肝病毒包膜蛋白编码基因的适应性进化. 科学通报.2006, 51:1894-1899
29. 张原,陈之端. 分子进化生物学中序列分析方法的新进展.植物学通报.2003,20: 462-468
30. 张雅丽, 杨国庆, 郭英等. 密码子优化的牛精蛋白基因在大肠杆菌中的表达. 高技术通讯,2002,4:42-46
31. 张亚平. 从 DNA 序列到物种树[J]. 动物学研究,1996,17:247-252
32. 郑用琏.基础分子生物学.北京: 高等教育出版社,2007:186-198
33. 周猛, 童春发, 施季森. 杨树派间不同种的遗产密码子使用频率分析.Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34:555-561
34. 周琦, 王文. DNA 水平自然选择作用的检测. 动物学研究.2004, 25:73-80
35. 周忠和. 潘氏北票鲟的新材料及鲟类系统关系. 古脊椎动物学报. 1992,30: 85-101
36. Arnason U, Gullberg A, Janke A, et al. Mitogenomic analyses of deep gnathostome divergences:a fish is a fish. Gene. 2004, 333:61-70
37. Artyukhin E N. On biogeography and relationships within the genus *Acipenser*. Sturgeon Quart.1995,3:6-8

38. Artyukhin E N. Morphological Phylogeny of the Order Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22 (Suppl.1):66-69
39. Avise J C, Bowen B W, Lamb T, et al. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, 9:457-473.
40. Bargelloni L, Marcato S, Patarnello T. Antarctic fish hemoglobins: evidence for adaptive evolution at subzero temperatures. *The national academy of sciences of the USA*, 1998, 95:8670-8675
41. Bazin E, Glemin S, Galtier N. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*. 2006, 312:570-572
42. Bemis W E, Findeis E K, Grande L. An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes*, 1997a, 48:25-71
43. Bemis W E, Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to Acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes*, 1997b, 48:167-183
44. Bensasson D, Zhang D X, Hartl D L, et al. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, 16, 314-321.
45. Billard R, Lecointre G. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2001, 10:355-392
46. Birstein V J, Hanner R, DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48:127-155
47. Birstein V J, Vasiliev V P. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces) karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species. *Genetica*, 1987, 72:3-12
48. Birstein V J, DeSalle R. Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Molecular Biology and Evolution*. 1998, 9:141-155
49. Birstein V J, Doukakis P, Desalle R. Molecular phylogeny of Acipenseridae: non-monophyly of Scaphirhynchinae. *Copeia*. 2002, 2:287-301
50. Bromham L, Penny D, Rambaut A, et al. The power of relative rates tests depends on the data. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, 50:296-301
51. 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. *Genome Research*, 2001, 11(11):1958-1967
52. Brown J R, Beckenbach K, Beckenbach A T, et al. Length variation, heteroplasmy and

- sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon(*Acipenser*). *Genetics*, 1996, 142:525-535
53. Brown W M, Prager E M, Wang A, et al. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 1982, 18:225-239.
54. Brown W M, George M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS*.1979, 76(4):1967-1971
55. Comincini S, Lanfredi M, Rossi R, et al. Use of RAPD markers to determine the genetic relationship among sturgeon(*Acipenseridae*,*Pisces*). *Fisheries Science*. 1998, 64:35-38
56. Consuegra S H, Megens H, Schaschl H. Rapid evolution of the MHC class I locus results in different allelic compositions in recently diverged populations of Atlantic salmon. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22:1095-1106
57. Curole J P, Kocher T D. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999, 14:394-398
58. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences:a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17:368-376
59. Felsenstein J. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of genetics*, 1988, 22:521-565
60. Findeis E K. Osteology and phylogenetic interrelationships of sturgeon (*Acipenseridae*). *Environmental Biology of Fishes*.1997, 48, 73-126.
61. Fontana F, Tagliavini J, Congiu L. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica*, 2001, 111:359-373
62. Fontana F. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in *Acipenseriformes* (*Pisces*). *Genome*, 1994, 37(5):888-892
63. Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, et al. Chromosomal mapping of 18s-28s and 5s rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. *Genome*, 2003, 46:473-477
64. Ford M J, Thornton P J, Park L K. Natural selection promotes divergence of transferrin among salmonid species. *Molecular Ecology*, 1999,8:1055-1061
65. Ford M J. Molecular evolution of transferrin: evidence for positive selection in salmonids. *Molecular Biology and Evolution*,2001,18:639-647
66. Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 1993,133:

- 693-709.
67. Goldman N. Phylogenetic information and experimental design in molecular systematics. *Proceedings of the Royal Society*, 1998, 265:1779-1786
 68. Hasegawa M, Yano T, Kishino H. A new molecular clock of mitochondrial DNA and the evolution of Hominoids. *Proceeding of the Japan Academy.Ser.B: Physical and Biological Sciences*, 1984,60:95-98
 69. Hasegawa M, Kishino H. Confidence limits on the maximum-likelihood estimate of the Hominoid tree from mitochondrial DNA sequence. *Evolution*, 1989, 43:672-677
 70. Huelsenbeck J P. The performance of phylogenetic methods in simulation. *Systematic Biology*, 1995b, 44:17-48
 71. Huelsenbeck J P, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2003, 17:754-755.
 72. Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, et al. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the “ancient fish”. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 26:110-120
 73. Inoue J G., Miya M, Venkatesh B, et al. The mitochondrial genome of Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis* (Sarcopterygii: Coelacanthiformes) and divergence time estimation between the two coelacanths. *Gene*, 2005, 349:227-235.
 74. Jukes T H, Cantor C R. *Evolution of protein molecules. Mammalian Protein Metabolism*.1969, New York: Academic Press
 75. Kimura M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 1968, 217:624-626
 76. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16:111-120
 77. King C E, Jukes T H. Non-Darwinian evolution. *Science*, 1969, 164:788-798
 78. Krieger J, Fuerst P A, Cavender T M. Phylogenetic relationships of the north American sturgeon (Order Acipenseriformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 16:64-72.
 79. Krieger J, Hett A K, Fuerst P A, et al. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology*.2008, 24:36-45.
 80. Krieger J, Fuerst P A. Evidence of multiple alleles of the nuclear 18S ribosomal RNA gene in sturgeon (Family: Acipenseridae). *Journal of Applied Ichthyology*, 2002, 18:290-297

81. Krieger J, Fuerst P A. Characterization of nuclear 18S rRNA gene sequence diversity and expression in an individual lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Journal of Applied Ichthyology*, 2004, 20:433-439
82. Krieger J, Hett A K, Fuerst P A, et al. Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the Acipenseridae. *Journal of Heredity*, 2006, 97(3):218-225
83. Krieger J, Fuerst P A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 19:891-897.
84. Kumar S. Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2005, 6:654-662
85. Li W L, Wu C I, Luo C C. A new method for estimating synonymous and non-synonymous rates of nucleotide substitutions considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Molecular Biology and Evolution*, 1985, 2:150-174
86. Ludwig A, May B, Debus L, et al. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*. 2000, 156:1933-1947
87. Ludwig A, Belfiore N M, Pitra C, et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 2001, 158:1203-1215
88. Martin A P, Naylor G J P, Palumbi S R. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*. 1992, 357:153-155.
89. Meiklejohn C D, Montooth K L, Rand D M. Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends in Genetics*, 2007, 23(6):259-263
90. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 1986, 3(5):418-426
91. Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, 30:371-403
92. Nielsen R. Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*, 2005, 39:197-218.
93. Palumbi S R, Kwasing B. Population biology of the Trans-arctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins. *Evolution*, 1991, 45: 1790-1805
94. Patterson C. Morphology and interrelationships of primitive actinopterygian fishes.

- Amer Zool, 1982, 22:241-259
95. Peng Z, Ludwig A, Wang D, et al. Age and Biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes(Pisces:Acipenseriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.2007,42:854-862.
96. Pfister P, Rodriguez I. Olfactory expression of a single and highly variable V1r pheromone receptor-like gene in fish species. *The national academy of sciences of the USA*, 2005, 102:5489-5494
97. Pikitch E K, Doukakis P, Lauck L, et al. Status,trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries*, 2005,6:233-265
98. Qiao Y, Tang X, Brosse S, et al. Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)in the Yangtze River:a hydroacoustic assessment of fish location and abundance on the last spawning ground. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22(suppl.1):140-144
99. Rannala B, Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees:a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43:304-311
100. Robles F, Herrán R, Ludwig A, et al.Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon.*Genome*,2005,48:18-28
101. Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3:an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 15:174-175.
102. Rozhkovan K V, Chelomina G N, Ivanov S A. Phylogenetic relationships of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 based on 18S rDNA sequencing. *Cell and Tissue Biology*, 2009, 3(2):162-167
103. Russo C A M, Takezaki N, Nei M. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13:525-536
104. Sarich V M, Wilson A C. Generation time and genomic evolution in primates. *Science*, 1973, 179:1144-1147
105. Spady T C, Seehausen O, Loew E R, et al. Adaptive molecular evolution in the opsin genes of rapidly speciating cichlid species. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22:1412-1422
106. Swofford D L. PUAP*.Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. 2002, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
107. Tajima F. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis.

- Genetics.1993, 135:585-595.
108. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 1989, 123:585-595.
109. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, 10:512-526
110. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
111. Terai Y, Mayer W E, Klein J, et al. The effect of selection on a long wavelength-sensitive (LWS) opsin gene of lake victoria cichlid fishes. *The national academy of sciences of the USA*, 2002, 99:15501-15506
112. Venkatesh B, Erdmann M V, Brenner S. Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates. *The national academy of sciences of the USA*, 2001, 98:11382-11387
113. Wakeley J. The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *Trends in Ecology & Evolution*, 1996, 11:158-163.
114. Wei Q, He J, Yang D, et al. Status of sturgeon aquaculture and sturgeon trade in China: a review based on two recent nationwide surveys. *Journal of Applied Ichthyology*, 2004, 20:321-332
115. Wei Q, Ke F, Zhang J, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeon and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*.1997, 48:241-255
116. Wu W, Schmidt T R, Goodman M, et al. Molecular evolution of cytochrome c oxidase subunit I in primates: is there coevolution between mitochondrial and nuclear genomes? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 17:294-304
117. Yang Z, Nielsen R. Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19:908-917
118. Yang Z, Nielsen R, Goldman N, et al. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, 2000a, 155:431-449
119. Yang Z, Nielsen R, Goldman N, et al. Codon-Substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, 2000b, 155:431-449.

120. Yang Z, Bielawski J P. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 2000c, 15:496-503.
121. Zakon H H, Lu Y, Zwickl D J, et al. Sodium channel genes and the evolution of diversity in communication signals of electric fishes: convergent molecular evolution. *The national academy of sciences of the USA*, 2006, 103:3675-3680
122. Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13:933-942
123. Zhuang P, Ke F, Wei Q, et al. Biology and life history of Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*, in the Yangtze River. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48:257-264

致 谢

春风化雨，润物无声。回顾三年的求学生涯，导师渊博的学术知识、严谨的治学态度、执着的敬业精神以及启发式的教育风格都使我受益匪浅。导师为我创造良好的学习和科研环境，不仅使我学到了很多知识，而且给予了我充分的空间去学会做人做事。另外，在进行硕士论文过程中，导师还给了我参加第六届国际鲟鱼养护大会并发言的机会，这些机会将会让我受益终生。籍此论文完成之际，谨向危老师致以最诚挚的谢意！

感谢长江水产研究所汪登强副研究员，沈丽助理研究员，李忠博士，李创举博士，邹远超师姐、姚延丹师姐、张燕师姐、袁希平师兄、王长忠师兄带领我走进分子生物学实验室，感谢您们无私传授给我的理论知识、实验技巧以及在论文写作上的指导，这些点滴对我来说将是宝贵的财富！感谢汪登强老师和湖北天峡鲟业有限公司为我实验慷慨提供的鲟鱼样品；感谢邹远超师姐在我实验采样期间给予的帮助和关怀；感谢李创举师兄为我提供方便的测序途径！

本论文的顺利完成还得到了许多老师和同学的帮助。感谢长江水产研究所濒危鱼类保护课题组刘志刚老师，杜浩老师，李罗新老师，甘芳老师，张辉师兄，刘向伟师兄，孙庆亮师兄，张艳珍师姐，邱实师姐在学习、工作和生活中给予的关心和照顾，您们勤勤恳恳的学习、工作作风将是我牢记的榜样！同门杨璐，王成友，以及长江所同学仲维玮，赵巧玲，赵建华，周勇，肖艺，高宝峰，田辉伍，邓华堂；华农同学闫晓敏，陈秀荣，王树云，杨慧君，鲜莹，郑鹏飞，贺中华；还有 08、09 级的各位师弟师妹们，您们给了我诚挚的友谊，伴我度过了难忘的研究生生涯，在此表达我深深的谢意！

感谢我的父母，是他们的信赖与支持使我能够完成学业。他们教给我的生活经历我将受用一生。感谢男友李艳华，你的宽容、鼓励与支持一直是我前进的动力！

感谢所有关心和帮助过我的人们！

胡 佳

华中农业大学

附 录

攻读硕士学位期间发表的文章:

- [1]胡佳, 汪登强, 危起伟, 沈丽. 施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代的分子鉴定. 中国水产科学, 2010, 17(1): 21-30.
- [2]邹远超, 危起伟, 潘光碧, 沈丽, 胡佳. 施氏鲟精子诱导匙吻鲟雌核发育. 中国水产科学, 2009, 16(5): 728-735.

参加的学术会议:

1. 中国工程院第 77 场工程科技论坛, 上海, 2008.9, 参加
2. 第六届国际鲟鱼护养大会, 武汉, 2009.10, 作口头报告

报告题目:

Preliminary studies on cytochrome c oxidase subunit I gene in sturgeon
(Acipenseridae and Polyodontidae). Finished