

# 克氏光唇鱼线粒体基因组测定及光唇鱼属的系统发育分析

杨杨 宋小晶 唐文乔\* 张亚

海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学 上海 201306

**摘要:** 根据侧条光唇鱼 (*Acrossocheilus parallens*) 线粒体基因 (mtDNA) 序列设计引物, 采用引物步移和 PCR 扩增产物测序, 获得了克氏光唇鱼 (*A. kreyenbergii*) 的 mtDNA 全序列。结构分析表明, 克氏光唇鱼 mtDNA 为首尾闭合的环状基因, 全长 16 596 bp, 编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和两段非编码区 (D-loop 和轻链复制起点 OL), 碱基组成具有明显的 A + T 偏好和反 G 偏倚现象。13 个蛋白编码基因中, 除 CO I 的起始密码子是 GTG, 其余基因的起始密码子均为 ATG; 终止密码子包括完全的终止密码子 TAA (38.46%) 和 TAG (7.69%), 不完全的终止密码子 TA (15.38%) 和 T (38.46%)。在 D-loop 区的 811 ~ 837 bp 区间发现了一段“TA”短串联重复序列。从蛋白编码基因所包含的信息量、变异位点和变异率看, ND5、ND4、CO I 和 ND2 最适合作为光唇鱼属种间系统发育分析的分子标记。采用贝叶斯法利用 13 个蛋白编码基因所构建的系统发育树显示, 光唇鱼属和白甲鱼属 (*Onychostoma*) 的 24 种鱼类各自没有聚为单系群, 相互间不能明确区分。

**关键词:** 克氏光唇鱼; 线粒体基因组; 系统发育; 光唇鱼属

**中图分类号:** Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 02-207-13

## Complete Mitochondrial Genome of *Acrossocheilus kreyenbergii*, with Phylogenetic Analysis of Genus *Acrossocheilus*

YANG Yang SONG Xiao-Jing TANG Wen-Qiao\* ZHANG Ya

Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, National Demonstration Center for Experimental Fisheries

Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** According to the existing mitochondrial gene sequence of *Acrossocheilus parallens*, primers were designed, and by using the method of primer walking and PCR amplification, mitochondrial genome sequence of *A. kreyenbergii* was obtained, and its structure was analyzed. The results showed that the complete mitochondrial genome of *A. kreyenbergii* was a circular genome, 16 596 bp in length, including 13

**基金项目** 国家科技基础性工作专项 (No. 2015FY110200);

\* 通讯作者, E-mail: wqtang@shou.edu.cn;

**第一作者介绍** 杨杨, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类分子进化; E-mail: yyangyangy0308@163.com。

收稿日期: 2017-10-23, 修回日期: 2017-12-25 DOI: 10.13859/j.ejz.201802006

protein coding genes, 22 tRNA genes, 2 rRNA genes and two non-coding regions (D-loop and origin of light strand replication,  $O_L$ ). The base composition showed two features, the negative bias for G and AT bias. All protein-coding genes started with ATG as an initiation codon except CO I, which used GTG. Two complete termination codons were TAA (38.46%) and TAG (7.69%), and two incomplete stop codons were TA (15.38%) and T (38.64%). A control region of 941 bp in length between tRNA<sup>Pro</sup> and tRNA<sup>Phe</sup>, a short tandem repeat TA, was found in the 811 - 837 bp intervals. From the information contained in the protein coding gene, the mutation site and the mutation rate of view, ND5, ND4, CO I and ND2 were the most suitable molecular markers for interspecific phylogenetic analysis of *Acrossocheilus*. The phylogenetic tree constructed by Bayesian method for 13 protein coding genes showed that 23 species of *Acrossocheilus* and *Onychostoma* were not clustered into monophyletic groups, and could not be clearly distinguished from each other.

**Key word:** *Acrossocheilus kreyenbergii*; Mitochondrial genome; Phylogenetic analysis; *Acrossocheilus*

与其他脊椎动物一样, 鱼类线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 呈单一的闭合环状 DNA, 由重链 (H 链) 和轻链 (L 链) 两条链组成, 具自主复制、转录和翻译等能力 (郭新红等 2004)。其长度一般在 16 ~ 18 kb 之间, 包括 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和两段非编码区 (D-loop 和轻链复制起点  $O_L$ )。与核基因相比, mtDNA 具有母系遗传、进化速度快、分子小等特点, 因而使其成为鱼类进化遗传学、分子生态学、物种鉴定和保护生物学等研究的重要分子标记 (吕国庆等 1998, 肖武汉等 2000, 赵凯 2006, 陈四海等 2011, Bernt et al. 2013a)。

光唇鱼属 (*Acrossocheilus*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae), 是一类栖息在山涧小溪或湍急水流中的小型淡水鱼类, 分布在中国、越南和老挝 (伍献文等 1977, 方世勋等 1981, 黄少涛 1984, 林人端 1989, 单乡红等 2000)。分布于中国的 20 种全部栖息在长江及其以南水系, 其中的许多种类已完成 mtDNA 全序列测定 (Ai et al. 2013, Han et al. 2013, Ma et al. 2014, Cheng et al. 2015, Xie et al. 2016)。克氏光唇鱼 (*A. kreyenbergii*) 最早由 Regan (1908) 定名为 *Gymnastoma kreyenbergii*, Yuan 等 (2010) 通过外形特征的研究后发现, 克氏光唇鱼与带

半刺光唇鱼 (*Barbus cinctus* = *Acrossocheilus hemispinus*) 为同物异名。原始产地 “Nankancho, near Tinghsiang” 之前一直被错误地译为 “河北定县附近的南谷庄”, 实际应为江西萍乡市附近的南坑河, 主要分布于西江水系、鄱阳湖水系、浙江仙居和安徽石台 (伍献文等 1977, 单乡红等 2000, Yuan et al. 2010)。本研究旨在补充克氏光唇鱼 mtDNA 的全序列数据, 并结合已有的相关数据尝试探讨光唇鱼属和近缘属白甲鱼属 (*Onychostoma*) 的系统发育关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 线粒体全基因组的提取

克氏光唇鱼样本于 2015 年 10 月采自江西鹰潭市信江支流罗塘河, 用三层流刺网采集后, 用 95% 乙醇固定带回实验室, 置于 4 °C 备用。取背部肌肉 20 mg 放入培养皿中用蒸馏水浸泡, 中途更换一次蒸馏水。取出肌肉, 吸干水分, 放入 1.5 ml 离心管中, 再进行下一步操作。采用动物组织基因组 DNA 小量提取试剂盒 [生工生物工程 (上海) 有限公司] 提取基因组 DNA。选择双蒸水作为空白对照调零后, 用 Thermo nano drop 紫外分光光度计 (NANODROP 2000C) 测定样品在波长 260 nm 处的吸光度  $A$ , 即为样品 DNA 的浓度 (g/L)。

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

## 1.2 PCR 扩增

根据 NCBI 上已有的侧条光唇鱼 (*A. parallens*) mtDNA 全长, 在其保守序列区利用 Premier 6.0 设计引物, 并用 Oligo 6.0 对每条引物进行评价和修改, 获得的 13 对引物 (表 1) 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

区间 Interval	引物名称 primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
16S rRNA - Cyt b	CYTB-1F	CTAAAAGCATCGGTCTTGTAAAT
	16S-1R	CTTTCTGTTTAGGTGGCTGC
	16S-2R	TGTAGGCTTATTTGTATTATTTAT
	CYTB-2F	CTCCTTTCATCTTACATCTCACAG
	16S-3F	TGGGGTCAGGTGGGTATTA
COX3 - Cyt b	COX3-2F	CGCTGCCTGATACTGACACT
	CYTB-1R	GTGTGTTTTTCGTAGGCTTG
	COX3-3F	CTCTTATGACACCCGCACA
	CYTB-2R	CTGTAATGTATTCGTTTGCGC
	COX3-4F	GACTCAATGCGGGAACCTTA
	CYTB-3R	GGGGCTCCTATGATTACAAA
	COX3-5F	TTTCCGCTAACAGCAGTCT
16S rRNA - COXI	16S-1F	TCCTTCAGCCATTGTTG
	COXI-2R	TAGGGGCGGGTAGACTGT
	16S-2F	TCCTCTCACACTCGCCTTC
	COXI-3R	AAGTAGATGGATGCTCGCTG
COXI - COX3	COXI-2F	GGGTGCTGTATTGCCAT
	COX3-2R	TCCAGCAGTGTAAGAAGAAAGA
	COXI-3F	ATTGTGTGAACCTATTCTACCTGC

PCR 反应体系  $25\text{ }\mu\text{l}$ , 模板 DNA 为  $100\text{ ng}$ ,  $10\times\text{ PCR buffer } 2.5\text{ }\mu\text{l}$ , 引物各  $0.5\text{ }\mu\text{l}$  (浓度  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ),  $10\text{ mmol dNTPs } 2\text{ }\mu\text{l}$ ,  $2.5\text{ U}/\mu\text{l Taq DNA 聚合酶 (Sangon Biotech 公司) } 0.5\text{ }\mu\text{l}$ , 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足至  $25\text{ }\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $3\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (退火温度根据引物而定) 退火  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $40\text{ s}$ , 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。PCR 产物经  $1.0\%$

琼脂糖凝胶电泳检测, 确认获得目的条带后, 送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。

## 1.3 序列拼接

将测序获得的分段序列, 采用 DNASTar (Burland 1999) 中的 SeqMan 进行多序列拼接, 手动校正去除不准确的测序部分。用 Bioedit 7.1 (Hall 1999) 和 Mega 6.0 (Kumar et al. 2012) 统计序列总长、碱基组成和 AT 含量等信息。将拼接好的全序列提交到在线软件 Mitofish (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>), 检测是否首尾相接呈闭合环状。如果闭合, 再利用 MitoAnnotator (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/annotation/input.html>) 对序列中的基因进行注释。采用 tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 在线工具预测 tRNA 的二级结构, 并用人工辅助校正, 最后提交到 GenBank (登录号: KY094969)。

## 1.4 序列比对与系统发育分析

从 NCBI 上下载已有的 23 种光唇鱼属、白甲鱼属物种和外类群线粒体全序列 (序列号见附录)。利用 Clustal X 1.83 (Thompson et al. 1997) 将所有全序列进行多重比对, 并辅助人工校正。用贝叶斯法构建系统发育树, ModelTest 3.7 软件 (Posada et al. 1998) 分析序列的最适替代模型, 最终选择 GTR + I + G 模型作为最佳替代模型用于后续计算。利用 MrBayes 3.2 软件 (Ronquist et al. 2012) 进行贝叶斯分析, 采用马尔科夫链的蒙特卡洛 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 方法, 以随机树为起始树, 同时运行 4 条马尔科夫链 (1 条冷链及 3 条热链), 每 100 代取样 1 次, 去掉开始运行的 25% 老化树, 用剩下的 75% 构建 50% 一致树, 再用 Fig Tree 软件 (Rambaut 2012) 对一致树进行人工修改。

## 2 结果

### 2.1 克氏光唇鱼 mtDNA 的基因结构

测序后的分析发现, 克氏光唇鱼 mtDNA 为首尾闭合的环状基因, 全长  $16\ 596\text{ bp}$ , 共编

码 37 个基因, 包括 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因以及两段非编码区 (D-loop 和轻链复制起点  $O_L$ ) (图 1)。编码的 37 个基因中, 28 个基因位于重链 (H 链) 上, 另 9 个基因即 ND6 基因和 8 个 tRNA 基因

(tRNA<sup>Gln</sup>、tRNA<sup>Ala</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Cys</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Ser</sup>、tRNA<sup>Pro</sup> 和 tRNA<sup>Glu</sup>) 位于轻链 (L 链) 上。该 mtDNA 全序列的基因组成、密码使用、重叠和间隔情况见表 2。

### 2.2 克氏光唇鱼 mtDNA 的核苷酸组成

表 2 克氏光唇鱼 mtDNA 全序列的基因组成和结构

Table 2 Composition and structure of *Acrossocheilus kreyenbergii* mitochondrial genome

基因名称 Gene Name	位置 Position		基因间隔 Intergenic spacer (bp)	密码子 Codon		大小 Size (bp)	密码子数量 No. of codons	编码链 Coding strand
	起点 From	终点 To		起始 Start	终止 End			
tRNA <sup>Phe</sup>	1	69	0			69		H
12S rRNA	70	1025	0			956		H
tRNA <sup>Val</sup>	1026	1097	0			72		H
16S rRNA	1098	2776	0			1 679		H
tRNA <sup>Leu</sup> (UUA)	2777	2852	1			76		H
ND1	2854	3828	5	ATG	TAA	975	325	H
tRNA <sup>Ile</sup>	3834	3905	- 2			72		H
tRNA <sup>Gln</sup>	3904	3974	2			71		L
tRNA <sup>Met</sup>	3977	4045	10			69		H
ND2	4056	5091	0	ATG	T - -	1 046	348	H
tRNA <sup>Trp</sup>	5092	5162	2			71		H
tRNA <sup>Ala</sup>	5165	5233	1			69		L
tRNA <sup>Asn</sup>	5235	5307	33			73		L
tRNA <sup>Cys</sup>	5341	5407	- 1			67		L
tRNA <sup>Tyr</sup>	5407	5477	1			71		L
COI	5479	7029	0	GTG	TAA	1 551	517	H
tRNA <sup>Ser</sup> (UGA)	7030	7100	3			711		L
tRNA <sup>Asp</sup>	7104	7175	14			72		H
COII	7190	7880	0	ATG	T - -	691	230	H
tRNA <sup>Lys</sup>	7881	7956	1			76		H
ATP8	7958	8122	- 7	ATG	TAG	165	55	H
ATP6	8116	8798	0	ATG	TA-	683	228	H
COIII	8799	9583	0	ATG	TA-	785	261	H
tRNA <sup>Gly</sup>	9584	9655	0			72		H
ND3	9656	10004	0	ATG	T - -	349	116	H
tRNA <sup>Arg</sup>	10005	10074	0			70		H
ND4L	10075	10371	- 7	ATG	TAA	297	99	H
ND4	10365	11745	0	ATG	T - -	1 381	460	H
tRNA <sup>His</sup>	11746	11814	0			69		H
tRNA <sup>Ser</sup> (GCU)	11815	11883	1			69		H
tRNA <sup>Leu</sup> (UAG)	11885	11957	0			73		H
ND5	11958	13781	- 4	ATG	TAA	1 824	608	H
ND6	13778	14299	0	ATG	TAA	522	174	L
tRNA <sup>Glu</sup>	14300	14368	6			69		L
Cyt <i>b</i>	14375	15515	0	ATG	T - -	1 141	380	H
tRNA <sup>Thr</sup>	15516	15587	- 1			72		H
tRNA <sup>Pro</sup>	15587	15656	0			70		L
D-loop	15657	16596	0			941		H

H. 重链; L. 轻链。H. Heavy chain; L. Light chain.

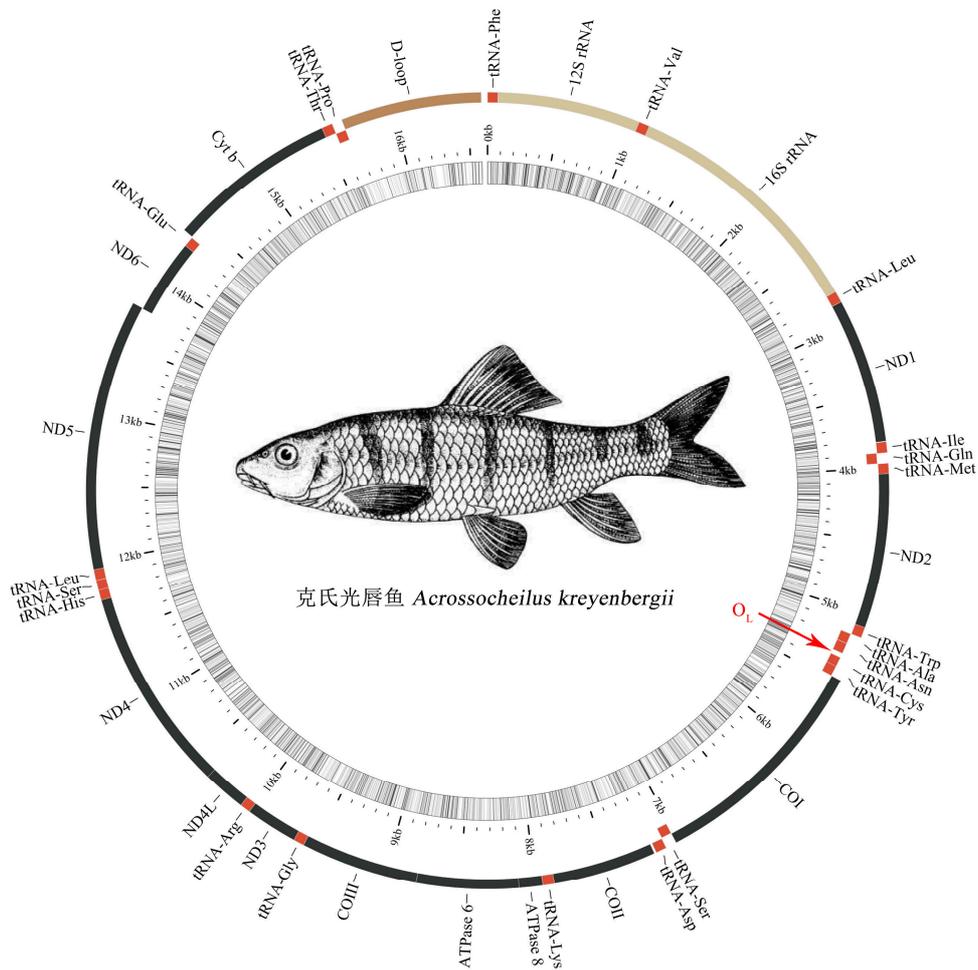


图 1 克氏光唇鱼线粒体基因结构图

Fig. 1 Gene organization of *Acrossocheilus kreyenbergii* mitochondrial genome

克氏光唇鱼 mtDNA 的碱基组成为 A 30.9%, T 25.1%, G 16.4%, C 27.6%, A + T 的含量 (56%) 明显大于 G + C 的含量 (44%), 与典型脊椎动物 mtDNA 碱基组成类似 (Perna 1995)。在 mtDNA 编码的 37 个基因中, 发现有 6 处基因重叠, 其中 3 处在 tRNA 基因间, 另外 3 处位于编码蛋白基因间, 分别是 ATP8/ATP6 (7 bp)、ND4L/ND4 (7 bp) 以及 ND5/ND6 (4 bp)。有 13 处基因间隔长度从 1 bp 至 33 bp 不等, 其中 tRNA<sup>Asn</sup> 和 tRNA<sup>Cys</sup> 之间的间隔最长。剩余 18 个基因紧密相连。

### 2.3 克氏光唇鱼 mtDNA 的编码基因

分析发现, 在 13 个编码蛋白基因

(protein-coding genes, PCGs) 中, 除了 CO I 的起始密码子是编码缬氨酸 (Val) 的 GTG 外, 其余 12 个 PCGs 的起始密码子均为编码甲硫氨酸 (Met) 的 ATG (表 2)。终止密码子的排布有 4 种情况, 分别是 2 种完全终止密码子 TAA 和 TAG, 以及 2 种不完全的终止密码子 TA 和 T, 其使用频率分别是 TAA (38.46%)、TAG (7.69%)、TA (15.38%)、T (38.46%) (表 2)。

克氏光唇鱼的 22 个 tRNA 均无内含子, 长度范围为 67~75 bp。除 tRNA<sup>ser</sup> (GCU) 外, 其余 21 个 tRNA 基因的二级结构均为典型的三叶草状 (图 2-1 和图 2-2)。三叶草结构包括 5~7 bp 的氨基酸接受臂、3~5 bp 的 T $\psi$ C 臂、4~

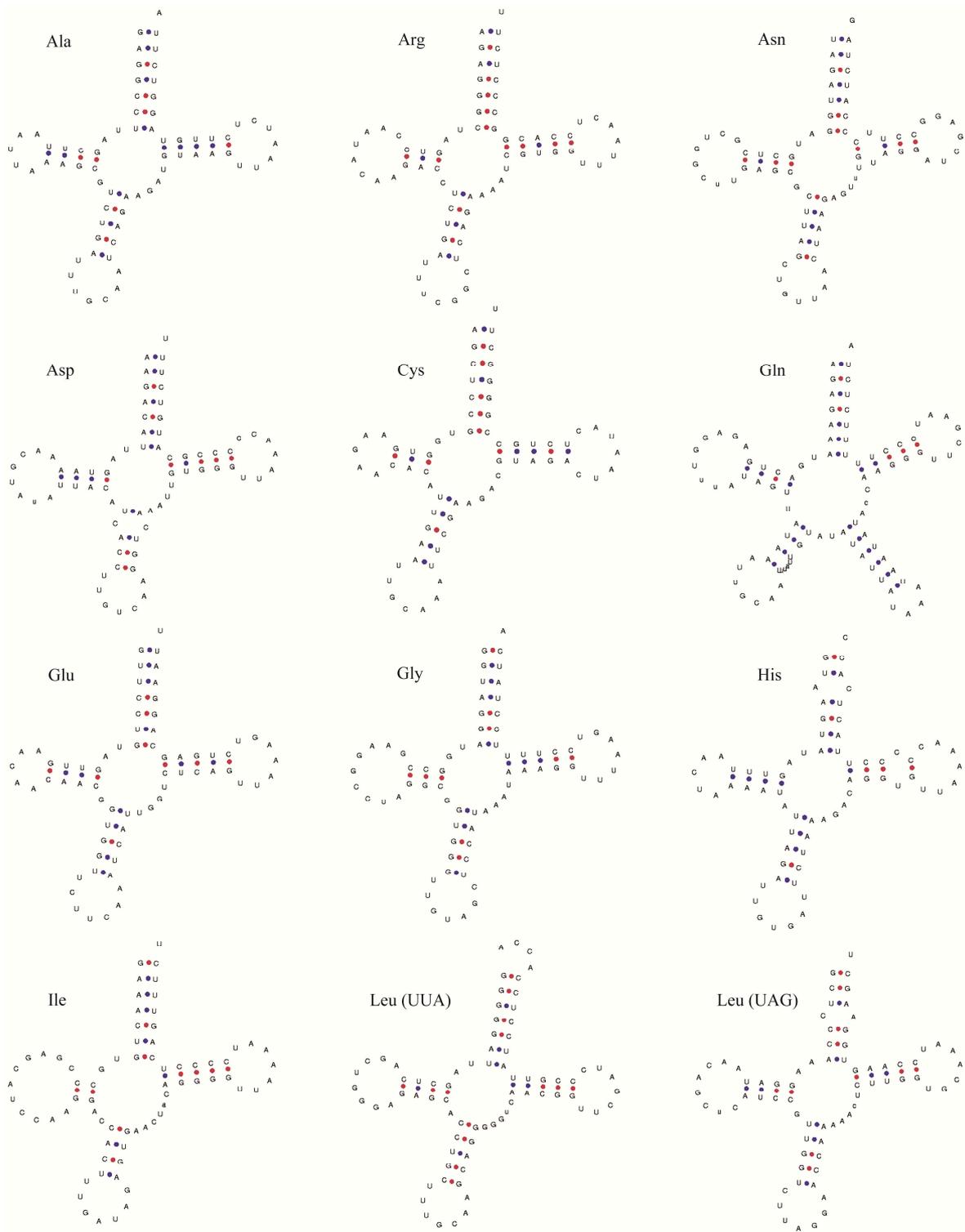


图 2-1 预测的克氏光唇鱼线粒体 22 个 tRNA 二级结构

Fig. 2-1 Deduced secondary structures for 22 tRNA genes from *Acrossocheilus kreyenbergii* mtDNA

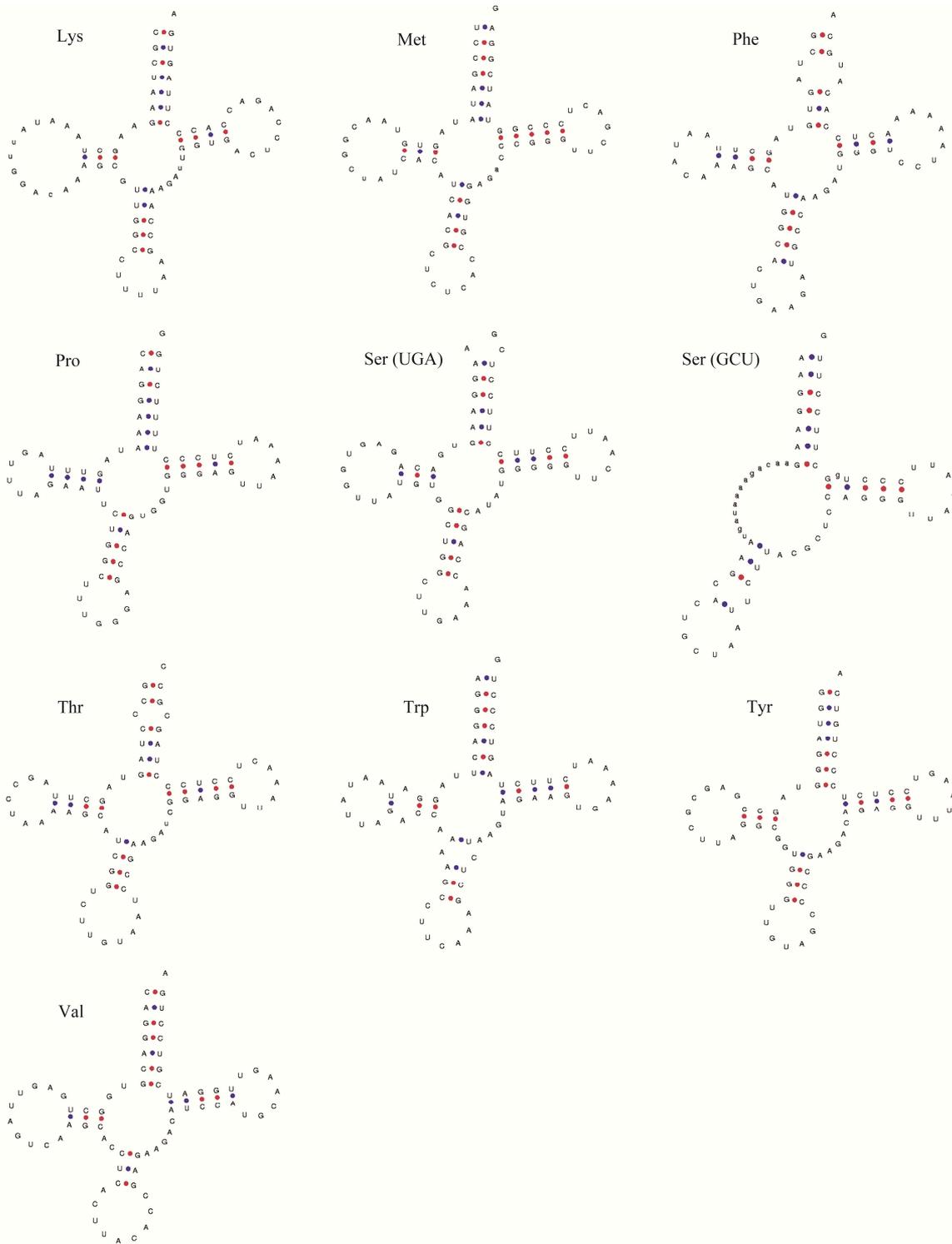


图 2-2 预测的克氏光唇鱼线粒体 22 个 tRNA 二级结构

Fig. 2-2 Deduced secondary structures for 22 tRNA genes from *Acrossocheilus kreyenbergii* mtDNA

5 bp 的反密码子臂和 3~4 bp 的 DHU 臂。其 2 个 rRNA 基因位于 tRNA<sup>Phe</sup> 和 tRNA<sup>Leu</sup> (UUA) 之间, 12S rRNA 和 16S rRNA 的长度分别是 956 bp 和 1 679 bp。控制区长为 941 bp, 位于 tRNA<sup>Pro</sup> 和 tRNA<sup>Phe</sup> 之间, 其核苷酸组成为 A (34.3%)、T (32.2%)、C (21.1%) 和 G (12.4%), A + T (66.5%) 明显大于 G + C (33.5%)。在控制区 811 ~ 837 bp 区间发现一段短串联重复序列, 即“TA”重复了 13 次。

#### 2.4 光唇鱼属 mtDNA 变异位点分析

恰当的标记基因是研究遗传多样性、系统进化以及亲缘地理的关键。从克氏光唇鱼及已测定 mtDNA 全基因组序列的 13 种光唇鱼属物种 (附录) mtDNA 13 个编码基因和 D-loop 区核苷酸变异位点的分析看 (表 3), ND5、CO I、ND4 和 ND2 等 4 个基因所包含的有效信息最多, 总位点均超过 1 000 bp; 而 ATP8、ND3、ND4L、ND6 等 4 个基因所包含的有效信息最少, 总位点均小于 600 bp。ATP8 的位点变异率最低, 仅为 18%; ND6、ND2、ND3、ND5、D-loop 的变异率均高于 30%, ND6 则高达 36%; ATP6、CO I、CO II、COIII、ND1、ND4、ND4L、

Cyt *b* 等 8 个基因的变异率介于 20% ~ 30% 之间。所有编码基因中, ND5 和 ND4 的变异位点数最多, 分别为 554 个和 391 个; ATP8 最少, 变异位点仅 30 个。

#### 2.5 光唇鱼属与白甲鱼属的系统发育分析

从 NCBI 上下载已有的 23 种光唇鱼属和白甲鱼属线粒体基因全序列 (附录), 加上本研究自测的克氏光唇鱼序列, 以鲃 (*Barbus barbuis*) 和银色鲃 (*Barbonymus gonionotus*) 作为外类群, 采用贝叶斯法对 13 个编码蛋白基因构建系统发育树 (图 3)。该系统发育树显示, 由外类群构成的分支 Clade IV 与由光唇鱼属和白甲鱼属构成的分枝 Clade I、Clade II 和 Clade III 一起构成姐妹群, 支持率达 100%。Clade I 和 Clade II 分别由光唇鱼属和白甲鱼属的种类所构成, 但 Clade III 则由光唇鱼属的宽口光唇鱼 (*A. monticola*)、云南光唇鱼 (*A. yunnanensis*) 和白甲鱼属的稀有白甲鱼 (*Onychostoma rara*)、高体白甲鱼 (*O. alticopus*) 聚合而成。可见, 光唇鱼属和白甲鱼属的所有种并没有各自聚为一个单系群, 即线粒体 13 个编码蛋白基因构建的系统发育树不能反映光唇鱼属和白甲鱼属各自

表 3 13 种光唇鱼属物种 mtDNA 13 个编码基因和 D-loop 区变异位点的比较

Table 3 Comparison of variation loci of 13 protein-coding genes and D-loop region of 13 species of *Acrossocheilus*

基因 Gene	总位点 No. of sites	保守位点 Conserved sites	变异位点 Variable sites	简约信息位点 Parsim-informative sites	单现突变 Singleton sites	突变率 (%) Mutation rate
ATP6	683	515	168	116	52	25
ATP8	165	135	30	21	9	18
CO I	1 551	1 192	395	243	116	25
CO II	691	518	173	119	54	25
COIII	785	611	174	121	53	22
ND1	975	700	275	168	107	28
ND2	1 046	722	324	216	108	31
ND3	349	235	114	75	39	33
ND4	1 381	990	391	269	122	28
DN4L	297	217	80	55	25	27
ND5	1 824	1 270	554	347	206	30
ND6	522	332	190	134	56	36
Cyt <i>b</i>	1 141	830	310	203	107	27
D-loop	963	668	286	197	86	30

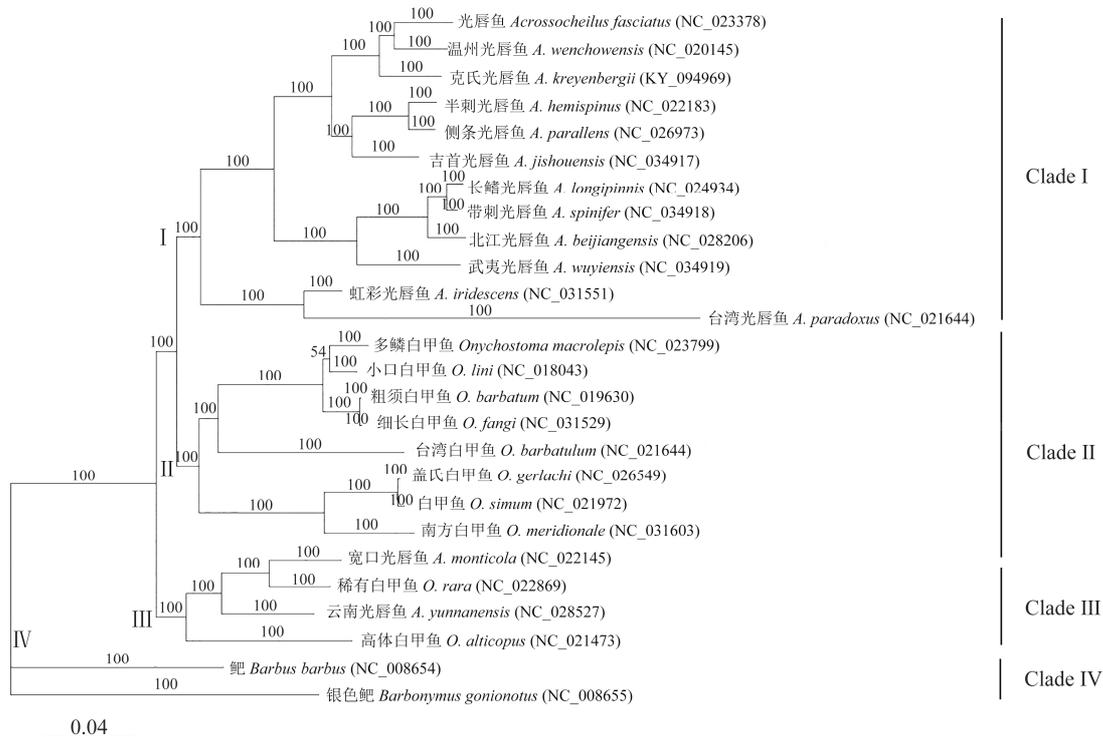


图3 基于线粒体13个编码蛋白基因构建的部分光唇鱼属和白甲鱼属贝叶斯系统发育树

Fig. 3 Partial Bayesian-tree of *Acrossocheilus* and *Onychostoma* based on mtDNA 13 protein-coding genes

的单系性。

另外,通过NCBI上的BLAST比对,发现克氏光唇鱼 mtDNA 全序列与温州光唇鱼 (*A. wenchowensis*) 和光唇鱼 (*A. fasciatus*) 的同源性最高,达 95%,而与台湾光唇鱼 (*A. paradoxus*) 的同源性最低,只有 85%,与光唇鱼属其余种的同源性处于这两者之间。从图 3 的系统发育树中也可发现,在光唇鱼属内克氏光唇鱼与温州光唇鱼和光唇鱼的亲缘关系最近,而与台湾光唇鱼和虹彩光唇鱼 (*A. iridescens*) 的亲缘关系最远,这与 mtDNA 全序列的 BLAST 同源性比对结果一致。

### 3 讨论

#### 3.1 克氏光唇鱼线粒体基因的结构特点

上述分析表明,克氏光唇鱼具有光唇鱼属鱼类 mtDNA 基因结构的共同特点。在核酸组成上,体现出明显的 A+T 偏好、反 G 偏倚现象 (Tanaka et al. 1994)。这可能与线粒体基因

复制的方式有关系,即重链 (H 链) 先复制,当 H 链复制到达轻链 (L 链) 复制起点 (origin of light strand replication,  $O_L$ ) 时, L 链才开始复制。这导致 L 链处于单链状态的时间相对较长,因而易发生碱基突变,致使较稳定的 G 碱基逐渐被其他碱基所代替 (Clayton 1982)。另一种观点认为,线粒体是细胞主要的能量场所,可能与其需要合成大量的 ATP 密切相关 (赵凯 2006)。克氏光唇鱼有两种不完全的终止密码子 T 和 TA,这可能是由于基因的 3'端与邻近的 tRNA 紧密相连或重叠所致 (Wolstenholme 1992)。但在转录过程中, mRNA 3'端的 Poly(A) 将会补充缺少的终止密码子 (Ojala et al. 1980, 1981)。这种以 TA 和 T 作为终止密码子的现象在其他鱼类动物中也有类似发现 (Cui et al. 2009)。克氏光唇鱼 L 链的复制起始区 ( $O_L$ ) 位于 tRNA<sup>Asn</sup> 和 tRNA<sup>Cys</sup> 之间,长 33 bp,这段序列的 5'和 3'端 10 余个碱基可形成回文序列,使得复制起始区 ( $O_L$ ) 能够折叠成发夹结构。

在鱼类、两栖类、哺乳类等也有类似的结构，但在爬行类、鸟类等还未发现 (Ojala et al. 1980, Wolstenholme et al. 1992, Cui et al. 2009, Liu et al. 2009)，这可能是脊椎动物线粒体基因组的一个进化特征。已有文献发现，其他光唇鱼属鱼类的 D-loop 区同样有短重复序列“AT”的富集现象，长度并不一致 (Wang et al. 2000, 贾永义等 2014)，本文发现克氏光唇鱼 D-loop 区 811 ~ 837 bp 之间有“TA”的 13 次重复。碱基的插入和缺失可形成不同的单倍型，但“AT”序列的插入和缺失并不会形成不同的单倍型 (Wang et al. 2000)。

NCBI 上已公布的光唇鱼属线粒体基因序列长度均在 16 590 ~ 16 605 bp 之间，仅序列号为 NC\_024844 的克氏光唇鱼 mtDNA 全序列长度达 16 849 bp。本文测得的序列号为 KY094969 的克氏光唇鱼 mtDNA 全序列长度为 16 596 bp，与前述 NC\_024844 序列相差 253 bp。不同地理种群间的序列长度可能存在差异，但标称克氏光唇鱼的 NC\_024844 序列没有提及样本的采集地，而本文的标本采自鄱阳湖水系的信江，这与 Yuan 等 (2010) 所指出的克氏光唇鱼分布地相吻合。由此看来，本文测得的克氏光唇鱼线粒体序列更符合光唇鱼属的一般特征，而 NC\_024844 可能存在样本的物种误鉴。

### 3.2 mtDNA 分子标记的筛选

与核 DNA 相比，鱼类 mtDNA 由于具有分子较小、基因排列紧凑、编码效率高、细胞内拷贝数多、进化速度快和母系遗传等特点，成为鱼类群体遗传结构、系统演化关系、分子生态学、遗传多样性及其保护生物学等研究的重要工具 (肖武汉等 2000, 赵凯 2006, 陈四海等 2011, Bernt et al. 2013a)。但不同区域的 mtDNA 进化速率并不相同，选择适合的分子标记是开展系统发育分析的关键。

一般认为，D-loop 区进化速度最快，常用于种内的进化研究；ND4、ND5、Cyt b 等进化速度中等，可用于种间系统发育分析；CO I 具有保守序列，最适合作为 DNA 条形码的分子

标记 (王中锋等 2009, 刘思情等 2010, 刘连为等 2012, Chan et al. 2016)。由于 DNA 测序技术的进步，采用 mtDNA 全序列开展鱼类种间和种内系统发育分析也已成为常态 (Liu et al. 2009, Wu et al. 2010, Bernt et al. 2013b, Zang et al. 2016)。

我们对光唇鱼属 14 种的 mtDNA 的分析发现，所有 13 个蛋白编码基因和 D-loop 区中，ND5、CO I、ND4 和 ND2 基因所包含的有效信息最多，ND6、ND2、ND3、ND5、D-loop 的变异率最高，而 ND5、CO I、ND4 和 ND2 的变异位点数最多。ND6 虽然变异率高达 36%，但其所包含的有效信息较少。ATP8 不仅总位点 (165 bp) 和位点变异率 (18%) 最低，变异位点也仅 30 个，不适合作为分子标记。在种内被广泛使用的 D-loop 区，进化速度最快，处于总位点、位点变异率和变异位点属的中等水平。从基因所包含的信息量、变异位点和变异率看，本文认为 ND5、ND4、CO I 和 ND2 基因是最适合作为光唇鱼属种间系统发育的分子标记。

### 3.3 光唇鱼属的单系性

白甲鱼属 *Onychostoma* 是 Günther (1896) 根据采自越南的 *Onychostoma laticeps* Günther [= *Onychostoma simum* (Sauvage et Dabry, 1896)] 为模式种所定的名称，原先作为突吻鱼属的一个亚属，后来提升为属，目前有 23 种 (伍献文等 1977, 单乡红等 2000, Froese et al. 2015)。光唇鱼属 *Acrossocheilus* 是 Oshima (1919) 根据采自我国台湾的台湾光唇鱼 (*Gymnostomus formosanus* Regan, 1908) [= *Acrossocheilus paradoxus* (Günther, 1868)] 为模式种所定的一个属，目前有 26 种 (伍献文等 1977, 单乡红等 2000, Yuan et al. 2006, Froese et al. 2015)。两者的主要形态区别是，白甲鱼属的下颌很宽，几乎完全露出，下唇瓣仅限于口角处，下颌形成锋利的角质前缘。而光唇鱼属的下唇开始与下颌分离，下颌前端露出，有革质或角质前缘形成，下唇瓣肥厚，左右唇后沟间隙变窄。

本研究采用贝叶斯法基于光唇鱼属和白甲鱼属共 24 物种 mtDNA 的 13 个编码蛋白基因序列所构建的系统发育树显示, 光唇鱼属和白甲鱼属两者可组成一个单系群, 但各自并没有聚为单系群。这与 Wang 等 (2007) 利用核基因 *RAG2*、Li 等 (2008) 采用线粒体 16S rRNA 基因、Yuan 等 (2015) 采用线粒体 D-loop 区序列、Yang 等 (2015) 采用 mtDNA 全序列及核基因 *RAG1* 以及 Zheng 等 (2016) 采用 mtDNA 全序列所获得的结果基本一致。另外, 从图 3 的系统发育树看, Clade I 均由光唇鱼属物种构成, Clade II 均由白甲鱼属的种类所构成, 它们分别构成了单系群。据此分析, Clade I 和 Clade II 分别代表了光唇鱼属和白甲鱼属, 而 Clade III 中原属于光唇鱼属和白甲鱼属的种类可能代表了另一个属级分类阶元。至于具体的类群划分, 还需要作更深入的研究。

**致谢** 赵振官实验师协助采集标本, 张春光研究员对文稿的写作提供宝贵意见, 特此致以真诚的感谢!

## 参 考 文 献

- Ai W, Chen X, Xiang D, et al. 2013. Complete mitochondrial genome of *Acrossocheilus wenchowensis* (Cyprinidae, Barbinae). *Mitochondrial Dna*, 24(3): 249–251.
- Bernt M, Bleidorn C, Braband A, et al. 2013b. A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 69(2): 352–364.
- Bernt M, Braband A, Schierwater B, et al. 2013a. Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2): 328–338.
- Burland T G. 1999. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software// Misener S, Krawetz S A. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 71–91.
- Chan J, Li W, Hu X, et al. 2016. Genetic diversity and population structure analysis of Qinghai-Tibetan plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) based on mtDNA D-loop sequences. *Biochemical Systematics & Ecology*, 69: 152–160.
- Cheng S H, Yan J J, Liu Y L, et al. 2015. The complete mitochondrial genome of the *Acrossocheilus fasciatus* (Cyprinidae, Barbinae). *Mitochondrial Dna*, 26(6): 941–942.
- Clayton D A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28(4): 693–705.
- Cui Z X, Liu Y, Li C P, et al. 2009. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene*, 432(1): 33–43.
- Froese R, Pauly D. 2015. FishBase. World Wide Web electronic publication. [EB/OL]. [2017-06-12]. <http://www.fishbase.org/>.
- Günther A. 1896. Report on the collections of reptiles, batrachians and fishes made by Messrs. Potanin and Berezowski in the Chinese provinces Kansu and Sze-chuen. *Ezhogodnik, Zoologicheskago Muzeya Imperatorskoi Akademii Nauk*, 1(3): 199–219, Pls. 1–2.
- Hall T A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41): 95–98.
- Han M, Wang C L, Shen C N, et al. 2013. The complete mitochondrial genome of half-spined barbel *Acrossocheilus hemispinus* (Nichols) (Teleostei, Cyprinidae, Barbinae). *Mitochondrial Dna*, 26(1): 133–134.
- Kumar S, Stecher G, Peterson D, et al. 2012. MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics*, 28(20): 2685–2686.
- Li J, Wang X, Kong X, et al. 2008. Variation patterns of the mitochondrial 16S rRNA gene with secondary structure constraints and their application to phylogeny of Cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 47(2): 472–487.
- Liu Y, Cui Z. 2009. The complete mitochondrial genome sequence of the cutlassfish *Trichiurus japonicus* (Perciformes: Trichiuridae): genome characterization and phylogenetic considerations. *Marine Genomics*, 2(2): 133–142.

- Ma X, Huang F, Wang Z. 2014. The complete mitochondrial genome sequence of *Acrossocheilus monticolus* (Teleostei, Cypriniformes, Cyprinidae). *Mitochondrial Dna*, 25(4): 54–55.
- Ojala D, Merkel C, Gelfand R, et al. 1980. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*, 22(2): 393–403.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290(5806): 470–474.
- Posada D, Crandall K A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817–818.
- Rambaut A. 2012. FigTree Version 1.4.0. [CP/OL]. [2017-06-12]. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. 2012. Mr Bayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539–542.
- Tanaka M, Ozawa T. 1994. Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations. *Genomic*, 22(2): 327–335.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(25): 4876–4882.
- Wang J P, Kc C T H. 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, 9(10): 1483–1494.
- Wang X, Li J, He S. 2007. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 42(1): 157–170.
- Wolstenholme D R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141(6): 173.
- Wu X, Xu X, Yu Z, et al. 2010. Comparison of seven Crassostrea mitogenomes and phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 57(1): 448–454.
- Xie X Y, Huang G F, Li Y T, et al. 2016. Complete mitochondrial genome of *Acrossocheilus parallens* (Cypriniformes, Barbinae). *Mitochondrial Dna*, 27(5): 1–2.
- Yang L, Sado T, Vincent H M, et al. 2015. Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 85: 97–116.
- Yuan L Y, Liu X X, Zhang E. 2015. Mitochondrial phylogeny of Chinese barred species of the cyprinid genus *Acrossocheilus* Oshima, 1919 (Teleostei: Cypriniformes) and its taxonomic implications. *Zootaxa*, 4059(1): 151–168.
- Yuan L Y, Wu Z Q, Zhang E. 2006. *Acrossocheilus spinifer*, a new species of barred cyprinid fish from south China (Pisces: Teleostei). *Journal of Fish Biology*, 68(Suppl B): 163–173.
- Yuan L Y, Zhang E. 2010. Type locality and identity of *Acrossocheilus kreyenbergii* (Regan, 1908), a senior synonym of *Acrossocheilus cinctus* (Lin, 1931) (Teleostei: Cyprinidae). *Zootaxa*, 62(2684): 36–44.
- Zang X, Yin D, Wang R, et al. 2016. Complete mitochondrial DNA sequence and phylogenetic analysis of *Oxyeleotris lineolatus* (Perciformes, Eleotridae). *Mitochondrial Dna Part A: Dna Mapping, Sequencing, & Analysis*, 27(4): 2414–2416.
- Zheng L P, Yang J X, Chen X Y. 2016. Molecular phylogeny and systematics of the Barbinae (Teleostei: Cyprinidae) in China inferred from mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Systematics & Ecology*, 68: 250–259.
- 陈四海, 区又君, 李加儿. 2011. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展. *生物技术通报*, (3): 13–20.
- 方世勋. 1981. 鲃亚科//郑葆珊. 广西淡水鱼类志. 南宁: 广西人民出版社, 67–111.
- 郭新红, 刘少军, 刘巧等. 2004. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. *遗传学报*, 31(9): 983–1000.
- 贾永义, 蒋文枰, 顾志敏. 2014. 温州光唇鱼线粒体基因组结构及系统发育分析. *上海海洋大学学报*, 23(1): 22–30.
- 黄少涛. 1984. 鲃亚科//朱元鼎. 福建鱼类志: 上册. 福州: 福建科学技术出版社, 337–338.
- 林人端. 1989. 鲃亚科//郑慈英. 珠江鱼类志. 北京: 科学出版社, 438.
- 刘连为, 许强华, 陈新军. 2012. 基于线粒体 CO I 和 Cyt b 基因序

- 列的北太平洋柔鱼种群遗传结构研究. 水产学报, 36(11): 1675–1684.
- 刘思情, 张家波, 唐琼英, 等. 2010. 基于 ND4 和 ND5 基因序列分析的鳅超科鱼类系统发育关系. 动物学研究, 31(3): 221–229.
- 吕国庆, 李思发. 1998. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展. 中国水产科学, 5(3): 94–103.
- 单乡红, 林人端, 乐佩琦, 等. 2000. 鲃亚科. // 乐佩琦. 中国动物志: 硬骨鱼纲 鲤形目: 下卷. 北京: 科学出版社, 100–103.
- 王中铎, 郭显嵩, 陈荣玲, 等. 2009. 南海常见硬骨鱼类 CO I 条形码序列. 海洋与湖沼, 40(5): 608–614.
- 伍献文, 等. 1977. 中国鲤科鱼类志: 下卷. 上海: 上海人民出版社, 272–298.
- 肖武汉, 张亚平. 2000. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 24(4): 384–391.
- 赵凯. 2006. 鱼类线粒体 DNA (mtDNA) 及其在分子系统学中的应用. 青海大学学报, 24(2): 49–53.

## 附录 部分光唇鱼属和白甲鱼属线粒体全基因组信息

Appendix Parts of mitochondrial genome information of *Acrossocheilus* and *Onychostoma*

属 Genus	物种 Species	GenBank 号 No. of GenBank	属 Genus	物种 Species	GenBank 号 No. of GenBank
光唇鱼属 <i>Acrossocheilus</i>	北江光唇鱼 <i>A. beijiangensis</i>	NC_028206	白甲鱼属 <i>Onychostoma</i>	高体白甲鱼 <i>O. alticopus</i>	NC_021473
	光唇鱼 <i>A. fasciatus</i>	NC_023378		粗须白甲鱼 <i>O. barbatum</i>	NC_019630
	半刺光唇鱼 <i>A. hemispinus</i>	NC_022183		台湾白甲鱼 <i>O. barbatulum</i>	NC_021644
	虹彩光唇鱼 <i>A. iridescens</i>	NC_031551		细长白甲鱼 <i>O. fangi</i>	NC_031529
	长鳍光唇鱼 <i>A. longipinnis</i>	NC_024934		盖氏白甲鱼 <i>O. gerlachi</i>	NC_026549
	宽口光唇鱼 <i>A. monticola</i>	NC_022145		小口白甲鱼 <i>O. lini</i>	NC_018043
	侧条光唇鱼 <i>A. parallens</i>	NC_026973		多鳞白甲鱼 <i>O. macrolepis</i>	NC_023799
	温州光唇鱼 <i>A. wenchowensis</i>	NC_020145		南方白甲鱼 <i>O. meridionale</i>	NC_031603
	云南光唇鱼 <i>A. yunnanensis</i>	NC_028527		白甲鱼 <i>O. simum</i>	NC_021972
	武夷光唇鱼 <i>A. wuyiensis</i>	NC_034919		稀有白甲鱼 <i>O. rara</i>	NC_022869
	带刺光唇鱼 <i>A. spinifer</i>	NC_034918	外群 Outgroup		
	吉首光唇鱼 <i>A. jishouensis</i>	NC_034917	银色鲃 <i>Barbonymus gonionotus</i>	NC_008655	
	台湾光唇鱼 <i>A. paradoxus</i>	NC_021644	鲃 <i>Barbus barbus</i>	NC_008654	