

圆斑星鲽线粒体基因组全序列结构及其进化

赫崇波¹, 高祥刚¹, 王效敏², 刘卫东¹, 周遵春¹, 木云雷¹, 葛陇利³

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁师范大学 实验分析中心, 辽宁 大连 116029; 3. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 利用圆斑星鲽 (*Verasper variegatus* Temminck et Schlegel) 和相关鱼类的部分线粒体基因序列, 设计出 6 对扩增引物, 通过 PCR 扩增产物直接测序和引物行走 (Primer walking) 法测定圆斑星鲽线粒体基因组全序列, 并对其进行结构与进化分析。圆斑星鲽线粒体基因组序列长 17 273 bp, 其基因序列及构成都与其他硬骨鱼基本相同, 包括 37 个基因 (2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因和 13 个蛋白质编码基因) 和 2 个非编码区 (控制区和 WANCY 区)。在 22 个 tRNA 基因中, tRNA^{Gln}、tRNA^{Ala}、tRNA^{Asn}、tRNA^{Cys}、tRNA^{Tyr}、tRNA^{Ser} (第 2 个)、tRNA^{Glu} 和 tRNA^{Pro} 的编码基因位于 L 链上, 其余则位于 H 链上。在 13 个蛋白质编码基因中, 除了 COI 基因的起始密码子为 GTG 外, 其余均以 ATG 为起始密码子。蛋白质编码基因包括具有完整 TAA 终止密码子的 ND1、COI、ATP8、ND4L、ND5, 而其他蛋白编码基因则具有不完全终止密码子。在 L 链上, ND6 是仅有的一个蛋白质编码基因。圆斑星鲽的控制区包含 1 个终止相关序列区 (ETAS)、6 个中央保守序列区 (CSB-A、B、C、D、E、F) 和 3 个保守序列区 (CSB-1、2、3) 以及长串联重复区 (Tandemly repeat sequence)。用 NJ 法和 MP 法对 5 个目 22 种鱼 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列进行系统分析, 结果显示, 圆斑星鲽与石鲽关系最近, 鲽形目的鲆、鲽类与鲈形目的 科 (Carangidae)、鲷科 (Sparidae) 鱼类亲缘关系较近, 而同属于鲽形目的塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*) 没有和任何目聚在一起, 成为一个独立的分支。圆斑星鲽的基因组全序列序列已提交到 GenBank, 登录号为 DQ403797, 控制区单元型序列的 GenBank 登录号为 DQ834444~7。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 584-592]

关键词: 圆斑星鲽; 线粒体基因组; 控制区; 系统进化

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)04-0584-09

由于线粒体 DNA (mt DNA) 具有长度短、含量丰富、偏母遗传和进化速度快等特点^[1], 已被作为一种较为理想的分子标记应用于生物遗传多样性、进化分类和渔业加工产品鉴定等方面研究^[2-4]。虽然在某些物种里发现了线粒体基因的基因重组现象, 但在脊椎动物中, 线粒体基因组的结构和序列非常保守^[5]。由于线粒体基因组具有这些特性, 它可以有效的用于硬骨鱼类间的亲缘关系及分类地位的分析研究^[6]。

圆斑星鲽 (*Verasper variegatus* Temminck et Schlegel) 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、鲽科 (Pleuronectidae)、星鲽属 (*Verasper*)^[7], 是分布于中国黄渤海及日本九州和朝鲜海域的大型珍贵鱼类, 其肉质细嫩鲜美, 营养价值很高, 具有十分广阔的开发前景, 国内外学者先后开展了圆斑星鲽生物学^[1]、繁殖生物学^[2-3]和分子生物学^[8]方面的研究, 但是圆

斑星鲽线粒体基因组 DNA 全序列的研究尚未见报道。本研究利用 GenBank 中已有的圆斑星鲽及其相关鱼类线粒体的部分 Cytb、16S rRNA、ND5、控制区和 COI 基因序列^[9], 设计扩增引物, 测定了圆斑星鲽线粒体基因组 DNA 全序列, 并对其进行了结构分析, 同时利用线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因序列, 分析了相关鱼类的系统分类关系。

1 材料与方法

1.1 材料

圆斑星鲽成鱼采集于大连沿海, 选取 1 尾取其背部肌肉置于液氮中迅速冷冻, 然后取出保存在 -70℃ 冰箱中备用。取肌肉组织约 50~100 mg, 按常规酚氯抽提方法^[10]提取基因组 DNA。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

1.2.1 扩增引物设计

根据 GenBank 中已知的部

收稿日期: 2006-09-24; 修订日期: 2007-03-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571410); 国家海洋科技推进平台与运行项目 (2005-2007)。

作者简介: 赫崇波 (1961-), 男, 研究员, 研究方向为动物分子遗传学. E-mail: hechongbo@hotmail.com

分圆斑星鲈及其相关鱼类线粒体基因序列,应用 FastPCR v3.6 引物设计软件设计线粒体扩增引物(F 代表正向引物,R 代表反向引物),分段扩增线粒体基因组 DNA。引物组合 DL_16S 扩增片段为 D-loop 至 16S rRNA,16S_COI 扩增 16S rRNA 至 COI,COI_Leu 扩增 COI 至 tRNA^{Leu},Leu_ND5 扩增 tRNA^{Leu}至 ND5,ND5_Cytb 扩增 ND5 至 Cytb,Cytb_DL 扩增 Cytb 至 D-loop 区之间的线粒体片段。引物名称、序列、GenBank 登录号和 PCR 扩增条件见表 1。这些扩增引物同时也作为双链测序时的起始测序引物。

由于 PCR 产物直接测序法不能准确读出其测序引物后面 50 bp 左右的序列,因此在设计片段扩增引

物时,尽可能保证相邻扩增片段之间包含 100 bp 以上的序列重叠。但是受已有序列和引物设计条件的限制,扩增片段 COI 至 tRNA^{Leu}和 tRNA^{Leu}至 ND5 的扩增引物 Leu_ND5F 和 COI_LeuR,以及扩增片段 tRNA^{Leu}至 ND5 和 ND5 至 Cytb 之间的扩增引物 Leu_ND5R 和 ND5_CytbF 分别是由同一段序列的正、反向序列设计而成,没有足够的重叠序列,这样通过 PCR 产物直接测序就会造成此扩增片段之间存在 100 bp 左右的缺口,针对这种情况采取的措施是,待这些片段测序后再设计覆盖缺口的扩增引物,重新对线粒体基因组 DNA 进行 PCR 扩增和扩增产物直接测序。

表 1 圆斑星鲈线粒体扩增引物设计及扩增条件
Tab.1 Primers and PCR conditions for amplification of *Veraper variegatus*

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank Acc. No.	产物 大小 /bp Size	扩增条件 (35 个循环) PCR condition (35cycles)
DL_16SF	ACGCAGTGTTCATACGATACGCATGC	AY218654 ^[8]	4 100	95 ℃ 2 min-60 ℃ 1 min-72 ℃ 4 min
DL_16SR	CATTAGGATGTCTGATCCAACATC	DQ242488		
16S_COI F	CGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTC	DQ242488	4 200	95 ℃ 2 min-60 ℃ 1 min-72 ℃ 4 min
16S_COI R	GGTTTCGGTCCGTCAGTAGCATTG	DQ242490		
COI_LeuF	CCGGAATAGTGGGGACAGGCCTTA	DQ242490	6 300	95 ℃ 3 min-60 ℃ 1 min-72 ℃ 5 min
COI_LeuR	TGCTACTTGGATTGCAACCAAGAG ^[11]			
Leu_ND5F	TCTTGGTGCAAAATCCAAGTAGCA ^[11]		1 000	95 ℃ 1 min-60 ℃ 1 min-72 ℃ 1 min
Leu_ND5R	CTGGCTGGATGTAGAAAATGCG	DQ242494		
ND5_CytbF	CGCATTTTCTACATCCAGCCAG	DQ242494	1 850	95 ℃ 1 min-60 ℃ 1 min-72 ℃ 2 min
ND5_CytbR	GATGCGCCGTTGGCATGGATGCT	DQ242492		
Cytb_DLF	CTCCCTGCCCCCTCTAATATCT	DQ242492	1 500	95 ℃ 1 min-60 ℃ 1 min-72 ℃ 2 min
Cytb_DLR	TAACTGATGAGTGTCTGTTCG	AY218654 ^[8]		

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 25 μL,包括灭菌水 16.75 μL,dNTP (10 μmol/L) 2.5 μL,10×Buffer 2.5 μL,50 μmol/L 的 MgCl₂ 1 μL,上下游引物 (10 μmol/L)各 0.5 μL,LA Taq DNA 聚合酶 (1 U) 0.25 μL 以及 50 ng DNA 模板。反应在 Eppendorf Gradient PCR 仪中进行,扩增程序为 95 ℃ 预变性 5 min,然后 35 个循环 (95 ℃ 变性 1~3 min,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1~5 min),见表 1。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将含有目标 DNA 的产物纯化后作为模板,用 ABI 3730 DNA 序列分析仪 (TaKaRa,Dalian)进行正反链双向测序。测序过程中,根据测得的序列设计数个 Walking 引物(视被测

片段大小)继续测序,直至片段测通。对于片段之间未覆盖的部分序列,利用已测出相邻片段的两端序列,再设计 6 对特异性引物进行扩增和测序。同时,为了研究圆斑星鲈不同个体之间 D 环控制区片段是否存在长度多态性,设计了 1 对 D-loop 控制区扩增特异性引物,对 24 个圆斑星鲈个体进行扩增和测序。

1.3 mtDNA 片段拼接及序列分析

对于测定的 DNA 片段序列首先采用电脑软件 Sequencing Analysis v3.4.1 (Applied Biosystems)和 Seqman v5.05 (DNASTAR)进行拼接分析。通过 NCBI 的 Blastn 搜索,与其他已知鱼类如牙鲆

(*Paralichthys olivaceous*)^[11]和石鲮(*Platichthys bi-coloratus*)^[6]等的线粒体基因序列进行比较,从而对圆斑星鲮 mtDNA 上 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因定位。通过 tRNAscan-SE 软件(<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE>)进行 tRNA 的定位,但是此软件不能确定 tRNA^{Ser(ACY)}的位置,因此要根据与其上、下游邻接的 tRNA 基因(tRNA^{His}和 tRNA^{Leu(CMN)})确定其位置。参考与圆斑星鲮亲缘关系较近的一些鱼类和其他脊椎动物已知序列,推断出圆斑星鲮的 D-loop 控制区结构。

1.4 系统进化分析

从 GenBank 中下载了 5 个目 22 种鱼线粒体的 13 个蛋白质编码基因序列,应用 ClustalX1.83 和 Mega 3.0^[12]生物信息学软件的邻接法(NJ)和最大简约法(MP)进行系统分类树的构建和分析。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组的组成

圆斑星鲮线粒体基因组全序列长度为 17 273 bp,与其他脊椎动物线粒体基因组大小基本相同。在圆斑星鲮 mtDNA 的 H 链上,碱基组成为 A 26.2%、C 30.5%、G 16.1% 和 T 27.2%,其线粒体基因组的构成以及各基因大小和定位在硬骨鱼类 mtDNA 中是一致的(表 2)。整个基因组包含 13 个蛋白质编码基因、1 个 12S rRNA、1 个 16S rRNA 基因、22 个 tRNA 基因和 1 个 D-Loop 控制区。

2.2 不完全终止密码子和基因重叠

在 13 个线粒体蛋白质编码基因中,有 6 个基因具有不完整的终止密码子。其中,基因 COⅡ的末端是一个“T”碱基,紧接着是 tRNA^{Lys}的 2 个起始碱基“CG”,基因 ND4 则以碱基“T”终止,紧接着是 tRNA^{His}起始碱基“GT”,基因 Cytb 以“T”结尾再连 tRNA^{Thr}的起始碱基“GC”,基因 ND2 和 ND3 以“T”结尾,与其连接的 tRNA 的起始碱基是“AG”,因此,它们的终止密码子 TAA 只能是在 mRNA 转录后利用 Poly A 尾中 A 来完成;基因 COⅢ的末尾碱基是“TA”,而其下游 tRNA^{Gly}的起始碱基“A”,因此,该基因的终止密码子 TAA 的形成有两种可能,即可能是在 mRNA 转录后加 Poly A 来完成,或者通过其下游 tRNA 的起始碱基“A”来形成。

处于同一链上的 6 个蛋白质编码基因之间共有 3 个重叠结构,基因 ATPase8 和 ATPase6 之间有 6 bp 的共用碱基,ND4L 和 ND4 之间有 7 bp,ND5

和 ND6 有 8 bp 碱基重叠。

2.3 D-Loop 控制区

圆斑星鲮的控制区序列长 1 572 bp(图 1),其两端分别是 tRNA^{Pro}和 tRNA^{Phe}基因。其核苷酸组成为 A33.7%、T28.4%、C24.9% 和 G13.0%。控制区中有一个终止相关序列区(ETAS)、6 个中央保守序列区(CSB-A、B、C、D、E、F)和 3 个保守序列区(CSB-1、2、3),以及长串联重复区(Tandem repeat region)。重复序列长 443 bp,包含 7 个 61 bp 的完整重复单元和 1 个 16 bp 的不完全重复单元。它们的存在使得圆斑星鲮的控制区要比其他已知鱼类的显得更长些(与其同属的条斑星鲮, *Verasper moseri* 除外,1 888 bp)。除去这些重复序列,控制区的长度在硬骨鱼类中差别不大,均都在 1 kb 左右。

对圆斑星鲮 24 个个体的控制区序列进行 PCR 扩增分析,证实其控制区序列具有长度多态性。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测发现 4 种长度的片段(电泳图略),具有由大到小片段所包含的个体数分别为 12、3、6 和 3 个。对这 4 种长度类型的 PCR 产物进行测序,发现在这 4 种片段中重复单元数为 5~8 个,将个体重复单元数为 7 的圆斑星鲮个体用于线粒体全基因组测序。串联重复区以外区域无任何差异。表明圆斑星鲮的串联重复序列区的长度多态性是造成其 mtDNA 长度差异的主要原因。圆斑星鲮线粒体控制区的 4 种序列单元型已经提交到 GenBank 中,登录号分别为 DQ834444、DQ834445、DQ834446、DQ834447。

2.4 系统进化分析

以两栖类马达加斯加林蛙(*Mantella madagascariensis*)、爬行类乌龟(*Chinemys reevesi* turtle)、鸟类红原鸡(*Gallus gallus gallus* AP003322)和哺乳类黄牛(*Bos taurus*,)做外群,用 NJ 法和 MP 法根据 5 个目 22 种鱼的 13 个线粒体蛋白质氨基酸序列构建系统关系树(图 2)。结果显示,22 种鱼主要分为 3 大分支,鲮形目的鲮、鲮科与鲮形目的鲮科、鲮科鱼类聚为一支,与鲮科的日本竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)、大西洋竹荚鱼(*Trachurus trachurus*)、黑尻鲮(*Caranx melampygus*)和刺鲮(*Carangoides armatus*)构成姊妹群;而鲮形目鲮科鱼类塞内加尔鲮(*Solea senegalensis*)却不能聚到任何一组,成为一个独立的类群。鲤形目、鲈形目和鲑形目各自形成独立进化支。

表 2 圆斑星鲽的线粒体基因组构成

Tab.2 Characteristics of the *Verasper variegatus* mitochondrial genome

基因名称 Gene Name	起止位置 Begin and end	长度 /bp Length	位于 (H 或 L 链) Location (H or L strand)
tRNA-Phe	1 – 68	68	H
12S rRNA	69 – 1 017	949	H
tRNA-Val	1 018 – 1 090	73	H
16S rRNA	1 091 – 2 805	1 716	H
tRNA-Leu (UAA) 第一个	2 806 – 2 879	74	H
ND1	2 880 – 3 854	975	H
tRNA-Ile	3 860 – 3 930	71	H
tRNA-Gln	3 930 – 4 000	71	L
tRNA-Met	4 000 – 4 068	69	H
ND2	4 069 – 5 114	1 046	H
tRNA-Trp	5 115 – 5 186	72	H
tRNA-Ala	5 188 – 5 256	69	L
tRNA-Asn	5 258 – 5 330	73	L
WANCY (非编码区)	5 331 – 5 366	36	L
tRNA-Cys	5 367 – 5 431	65	L
tRNA-Tyr	5 432 – 5 499	68	L
CO I	5 500 – 7 056	1 557	H
tRNA-ser (UGA) 1st	7 060 – 7 130	71	L
tRNA-Asp	7 145 – 7 215	71	H
CO II	7 223 – 7 913	691	H
tRNA-Lys	7 914 – 7 986	73	H
ATPase8	7 988 – 8 155	168	H
ATPase6	8 146 – 8 828	683	H
CO III	8 829 – 9 613	785	H
tRNA-Gly	9 614 – 9 685	72	H
ND3	9 686 – 10 034	349	H
tRNA-Arg	10 035 – 10 103	69	H
ND4L	10 104 – 10 400	297	H
ND4	10 394 – 11 774	1 381	H
tRNA-His	11 775 – 11 844	70	H
tRNA-Ser (AGY) 2nd	11 845 – 11 911	67	H
tRNA-Leu (CUN) 2nd	11 916 – 11 988	73	H
ND5	11 989 – 13 827	1 839	H
ND6	13 823 – 14 344	522	L
tRNA-Glu	14 345 – 14 413	69	L
Cyt b	14 418 – 15 558	1 141	H
tRNA-Thr	15 559 – 15 631	73	H
tRNA-Pro	15 632 – 15 701	62	L
Control Region (非编码区)	15 702 – 17 273	1 572	H



图1 圆斑星蝶线粒体控制区结构

“|”表示各个区的分界，方框表示保守序列。其中，在ETAS区中，黑体部分表示TAS序列，阴影方框表示核心序列，无阴影方框表示核心序列的反向互补序列；在串联重复序列区中，双下划线表示重复序列区的全部序列，单下划线表示不完全重复单元。

Fig.1 Structure of D-loop control region of *Verasper variegatus*

Vertical bar ‘|’ indicates division of regions; the blocks show the conserved sequence boxes. In the ETAS, bold letters represent sequences of TAS; the sequence in the boxes and with shadow are conserved sequence of ETAS and the sequences in the boxes without shadow are the reverse complementary sequences. In repeated regions, double underlines show sequences of the repeated region and single underline truncate repeat sequence

3 讨论

3.1 非完全终止密码子和基因重叠

圆斑星鲽的13个蛋白编码基因中,有6个基因具有不完整的终止密码子。但是,这些终止密码子在硬骨鱼类并非保守。在 *Gonistoma*^[13] 和 *Arctic charr*^[14] mtDNA 中,基因 ND2 和 tRNA^{Trp} 之间没有序列重叠。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 ND3 基因以“T”终止而紧接的是 tRNA^{Arg} 的“AC”。在鱼类中,COIII 连接 tRNA^{Gly} 的这段基因结构不是保守的^[14]。鱼类的这些结构特性表明,在蛋白质编码基因与 tRNA 基因的重叠位置上,存在终止密码子的剪切现象。由于这种基因重叠结构的存在,使得对其阅读不可能以双剪接的方式进行。在有些细菌和线粒体中,对这段重叠基因的阅读是通过移码调用方式完成的^[15]。

3.2 控制区结构

线粒体控制区是与线粒体复制、转录等重要功能相关的非蛋白编码序列。一般来说,终止序列区(TAS)和保守序列区(CSB-1、2、3)在各类动物中普遍存在,其核心序列非常保守。中央保守区(CSB-A、B、C、D、E、F)虽然也很保守,但是,这6个保守序列在各类动物中的出现情况却有很大不同。在哺乳动物中仅缺少 CSB-A^[16];在鸟类中缺少 CSB-A 和 CSB-B^[17];在鱼类中识别了鲤形目^[18]、鲶形目^[19]和鲑类^[20]的 CSB-D、E、F;在大口胭脂鱼中只识别了 CSB-D^[21]。本研究利用相关鱼类和其他脊椎动物线粒体的同源序列比较,鉴别出圆斑星鲽以及鲽形目鱼类控制区中6个中央保守序列框(CSB-A、B、C、D、E、F)。这也是目前所发现的结构最完整、最特殊的脊椎动物线粒体控制区类型之一。

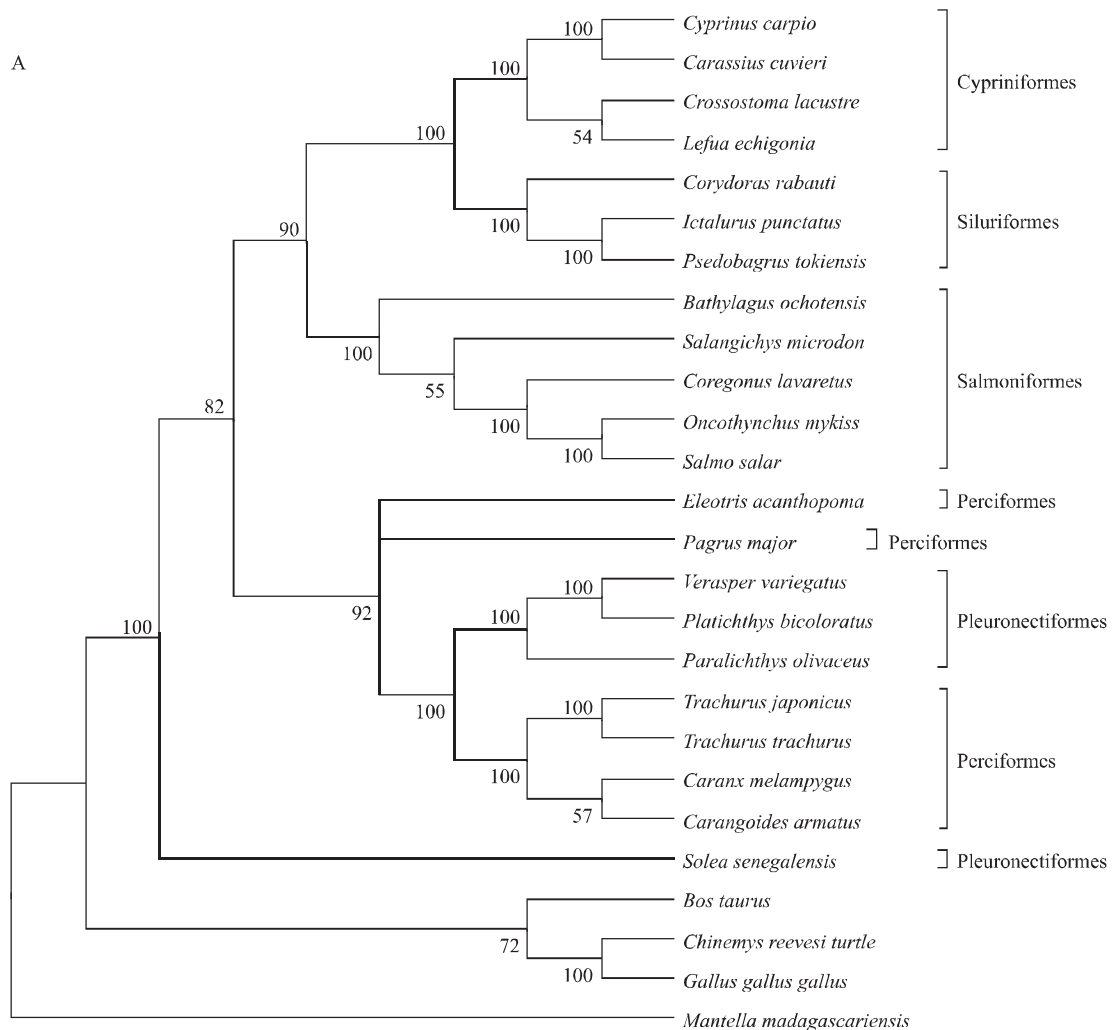


图 2-A Fig.2-A

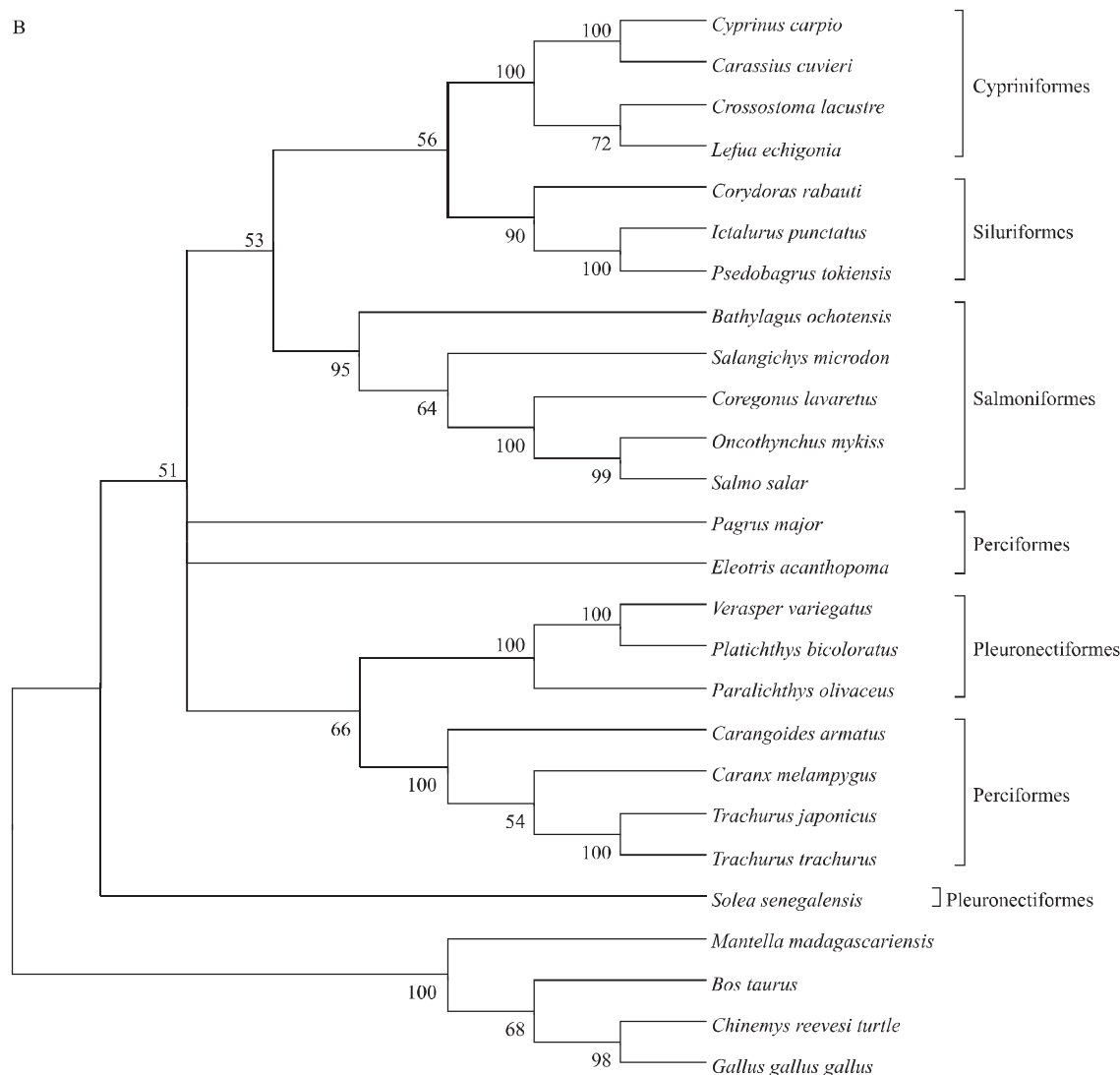


图2-B Fig.2-B

图2 线粒体13个蛋白质编码基因的氨基酸序列分析聚类结果

A: 采用邻接法 (NJ) 基于 *P*-Distance 模型所构建的一致树。B: 采用最简约法 (MP) 构建的一致树。分支节点的数值表示自引数值 (bootstrap), 重复 1 500 次。牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (AB028664), 川鲮 *Platichthys bicoloratus* (AP002951), 圆斑星鲮 *Verasper variegatus* (DQ403797), 塞内加尔鲮 *Solea senegalensis* (AB270760), 日本竹荚鱼 *Trachurus japonicus* (AP003092), 大西洋竹荚鱼 *Trachurus trachurus* (AB108498), 黑尻 *Caranx melampygus* (AP004445), 刺鲈 *Carangoides armatus* (AP004444), 真鲷 *Pagrus major* (AP002949), 刺鳍塘鳢 *Eleotris acanthopoma* (AP004455), 台湾湾口鳅 *Crossostoma lacustre* (M91245), 日本八须鳅 *Lefua echigonia* (AB054126), 鲤 *Cyprinus carpio* (X61010), 白鲫 *Carassius cuvieri* (AB045144), 斑点叉尾 *Ictalurus punctatus* (AF482987), 拟 *Pseudobagrus tokiensis* (AB054127), 美鲶 *Corydoras rabauti* (AB054128), 虹鳉 *Oncorhynchus mykiss* (L29771), 大西洋鲑 *Salmo salar* (U12143), 白鲑 *Coregonus lavaretus* (AB034824), 深海鲑 *Bathylagus ochotensis* (AP004101), 小齿日本银鱼 *Salangichys microdon* (AP004109), 黄牛 *Bos Taurus* (AY526085), 红原鸡 *Gallus gallus gallus* (AP003322), 乌龟 *Chinemys reevesi turtle* (AY676201), 马达加斯加彩蛙 *Mantella madagascariensis* (AB212225)。

Fig.2 Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of 13 mitochondrial coding genes conducted using MEGA version 3.0

A: NJ tree p-distance consensus tree with 1 500 replicates of bootstrapping. B: MP consensus tree with 1 500 replicates of bootstrapping. Nodal values represent percentage values of 1 500 bootstrapping. Legend of all mitochondrial sequences are available in GenBank databases *Paralichthys olivaceus* (AB028664), *Platichthys bicoloratus* (AP002951), *Verasper variegatus* (DQ403797), *Solea senegalensis* (AB270760), *Oncorhynchus mykiss* (L29771), *Salmo salar* (U12143), *Coregonus lavaretus* (AB034824), *Bathylagus ochotensis* (AP004101), *Salangichys microdon* (AP004109), *Crossostoma lacustre* (M91245), *Lefua echigonia* (AB054126), *Cyprinus carpio* (X61010), *Carassius cuvieri* (AB045144), *Trachurus japonicus* (AP003092), *Trachurus trachurus* (AB108498), *Caranx melampygus* (AP004445), *Carangoides armatus* (AP004444), *Pagrus major* (AP002949), *Eleotris acanthopoma* (AP004455), *Ictalurus punctatus* (AF482987), *Pseudobagrus tokiensis* (AB054127), *Corydoras rabauti* (AB054128), *Bos Taurus* (AY526085), *Gallus gallus gallus* (AP003322), *Chinemys reevesi turtle* (AY676201), *Mantella madagascariensis* (AB212225)。

圆斑星鲽线粒体控制区的CSB-3之后出现较长的串联重复序列,经过对鲽形目中的6种鲆、鲽鱼类和2种鲷类的比较研究后,发现它们都具有这种串联重复序列结构,但是鲆鲽类和鲷类的重复序列结构有所不同。在所分析的6种鲆、鲽类中,重复单元长度在60~65 bp之间,重复次数在5~13次,在重复单元之后还有1段不完整的重复序列,重复单元序列中存在“ACCTAA”和“TAAT”两个保守框,其功能尚不清楚。鲷科鱼类CSB-3之后的串联重复序列长度为346 bp和288 bp,其重复单元与鲆、鲽类不同,为“TATTACAA”和“TTATATACATG-TA”,在重复单元之后也有不完整重复序列。

关于圆斑星鲽串联重复次数是本研究通过测定的24个个体得出的,所测的个体还相对较少,实际上圆斑星鲽的控制区长串联重复数可能要大于5~8次。但是从本实验的测序结果似乎可以说明,重复序列的变化是以1个重复单元的插入或者缺失来实现的。

3.3 鲽形目进化与分类

鲽形目属于硬骨鱼类中比较特化的一个类群,包括鲆、鲽类和舌鲷、鲷类等。从用13个线粒体蛋白编码基因的氨基酸序列所构建的系统关系树可以看出,鲆、鲽鱼类与鲷形目鱼类聚为一个进化支,说明它们之间的亲缘关系较近,似乎可以推测鲆、鲽类是从鲷形目分化出来,这与焦燕^[22]等从骨骼结构研究所得出的“鲽形目应起源于鲷形目”的推断相符合。进一步推想,鲷形目塘鳢科(Eleotridae)的刺鳍塘鳢(*Eleotris acanthopoma*)和鲷科(Sparidae)的真鲷(*Pagrus major*)可能是处于鲷形目向鲽形目的鲆鲽类进化的中间类型。但是,同属于鲽形目的鲷科鱼类如塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)情况却没有和鲆、鲽类及鲷形目聚在一起,相反自己成为一个独立的支系,说明鲆鲽类和鲷类的亲缘关系较与鲷形目的亲缘关系要远。

参考文献:

- [1] Curole J P, Kocher T D. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes[J]. Tree, 1999, 14: 394-398.
- [2] Mackie I M, Pryde S E, Gonzales-Sotelo C, et al. Challenges in the identification of species of canned fish[J]. Trends Food Sci Tech, 1999, 10: 9-14.
- [3] Takeyama H, Chow S, Tsuzuki H, et al. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification[J]. J Fish Biol, 2001, 58: 1 646-1 657.
- [4] Chow S, Kishino H. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes[J]. J Mol Evol, 1995, 41: 741-748.
- [5] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. Nucl Acids Res, 1999, 27: 1 767-1 780.
- [6] Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderatescale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences[J]. Mol Biol Evol, 2001, 18: 1 993-2 009.
- [7] 王以康. 鱼类分类学[M]. 上海科技出版社, 1958. 532-540.
- [8] Ortega-Villaizón Romo M, Aritaki M, Suzuki S, et al. Genetic population evaluation of two closely related flatfish species, the rare barfin flounder and spotted halibut, along the Japanese coast[J]. Fish Sci, 2006, 72 (3): 556-567.
- [9] 陈四清, 于东祥, 马爱军, 等. 圆斑星鲽 (*Verasper variegatus* Temminck et Schegel) 生物学特性研究[J]. 现代渔业信息, 2002, 17 (10): 25-27.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南: 第3版[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Seito K, Hayashizaki K, Yokoyama Y, et al. Complete nucleotide sequence of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) mitochondrial genome: structural properties and cue for resolving teleostean relationships[J]. J Hered, 2000, 91 (4): 271-278.
- [12] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [13] Miya M, Nishida M. Organization of the mitochondrial genome of a deep sea fish, *Gonostomacile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes[J]. Mar Biotechnol, 1999, 1: 416-426.
- [14] Zardoya R, Garrido-Pertierra A, Bautista J M. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. J Mol Evol, 1995, 41: 942-951.
- [15] Mindell D P, Sorenson M D, Dimcheff D E. An extra nucleotide is not translated in mitochondrial ND3 of some birds and turtles[J]. Mol Biol Evol, 1998, 15: 1 568-1 571.
- [16] Southern S O, Southern P J, Dizon A E. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. J Mol Evol, 1988-1989, 28 (1-2): 32-42.
- [17] Randi E, Lucchini V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris* [J]. J Mol Evol, 1998, 47: 449-462.
- [18] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of cypriniformes[J]. Can J Zool, 2002, 80 (3): 569-581.
- [19] 张燕, 张鹤, 何舜平. 中国鲷科鱼类线粒体DNA控制区结构及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27 (5): 463-467.

- [20] 刘焕章. 鱼类线粒体控制区的结构与进化—以鲮鱼类为例 [J]. 自然科学进展, 2002, 12 (3): 266–270.
- [21] 曾青兰, 刘焕章. 大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区序列的研究 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2001, 23 (3): 261–264.
- [22] 焦燕, 邢智良, 杨秀霞, 等. 褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 与狭鳞庸鲽 (*Hippoglossus stenolepis*) 头颅骨骼特征的比较研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2000, 30 (2): 265–269.

Structure and evolution of complete mitochondrial genome of spotted halibut *Verasper variegatus*

HE Chong-bo¹, GAO Xiang-gang¹, WANG Xiao-min², LIU Wei-dong¹, ZHOU Zun-chun¹, MU Yun-lei¹, GE Long-li³

(1. Liaoning Ocean & Fisheries Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biotechnology, 50 Heishijiao street, Dalian 116023, China; 2. Experiment Center, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 3. College of Lifescience & Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023 China)

Abstract: Complete nucleotide sequence of mitochondrial genome for spotted halibut *Verasper variegatus* was determined by direct DNA sequencing on the PCR products amplified with 6 pair of primers which were designed on the basis of its partial mtDNA sequences and other related fish species. The complete sequence of the spotted halibut *Verasper variegatus* mitochondrial genome is 17 273 bp in length and showed a genome organization similar to other reported fish mitochondrial genomes. It contained 37 genes (2 rRNAs, 22 tRNAs and 13 protein coding genes) and 2 non-coding regions (D-loop control region and WANCY region). The tRNA^{Gln}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser} (the second one), tRNA^{Glu} and tRNA^{Pro} genes were encoded on the light strand (L strand), and the remainders are on the heavy strand (H strand). All protein-coding genes began with ATG as initiation codon except COI using GTG. Most of the protein-coding genes, including ND1, COI, ATP8, ND4L and ND5, had TAA as termination codon, while the others had incomplete termination codons. Among the 13 protein-coding genes, only ND6 was located on the L strand, the others were on the H strand. All the conservative sequence blocks (CSB-A, B, C, D, E, F and CSB-1, 2, 3) and the unique tandemly repeated clusters right after the CSB-3 block in the D-loop control region were characterized and analyzed. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of 13 mitochondrial coding genes conducted using MEGA version 3.0 showed that all the pleuronectiform species except for soleid species which had close phylogenetic relationship with perciformes and the soleid species had far evolutionary relationship with all other fish species. These new data provide a useful tool for many research areas, i. e. evolutionary study and identification of spotted halibut. The sequences have been deposited to GenBank with accession numbers of DQ403797 for the complete mitochondrial genome and DQ 834444, DQ 834445, DQ 83446, DQ 83447 for haplotypes of the control region. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 584–592]

Key words: *Verasper variegatus*; mitochondrial genome; control region; phylogeny

Corresponding author: HE Chong-bo. E-mail: hechongbo@hotmail.com