

养殖褐牙鲈细胞色素 b 基因序列的初步研究

高天翔^{1,2}, 张秀梅², 朱杰², 柳广东², 张亚平¹

(1. 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室, 云南昆明 650223;

2. 中国海洋大学水产学院, 山东青岛 266003)

摘要:对养殖褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的线粒体 DNA Cytb 基因的部分序列进行测定,测得的目的 DNA 片段的长度为 410 bp,其 A(104 bp)、T(119 bp)、C(117 bp)、G(70 bp) 4 种碱基平均含量分别为 25.4%、29.0%、28.5%、17.1%。在 28 个褐牙鲈个体中共出现了 3 种单倍型。白化褐牙鲈出现的第 1 种和第 3 种单倍型个体数分别为 10 尾(占白化褐牙鲈样本数的 90.91%)和 1 尾(9.09%);6 尾黑化褐牙鲈均出现第 1 种单倍型(100%);正常褐牙鲈出现的 3 种单倍型尾数分别为 7 尾(占正常褐牙鲈样本数的 55.56%)、2 尾(22.22%)和 2 尾(22.22%);测得的序列与已知序列间在第 6 bp、第 19 bp 和第 402 bp 碱基处出现差异。由于褐牙鲈 Cytb 基因的高度同源性,研究其白化、黑化和正常状态时出现的序列差异,对于寻找褐牙鲈白化机理研究的分子标记意义重大。

关键词:褐牙鲈;细胞色素 b;序列

中图分类号:Q343.1;Q959.486

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)02-093-04

褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)是牙鲈属 19 种鱼类中唯一分布在我国的一种,是东北亚特有种,属名贵经济鱼类^[1]。20 世纪 50~60 年代曾有上千吨渔获量后由于捕捞过度,资源已严重衰退^[1]。近几年来,褐牙鲈的人工养殖业取得了迅速发展^[1-2],但养殖褐牙鲈体色异常的发生率很高,平均高于 30%。其体色异常现象通常表现为眼侧皮肤部分或全部色素消失,形成全白或不规则的白色斑块(albinism),并常常伴随无眼侧皮肤的黑化现象(hypermelanosis)。目前大多数关于褐牙鲈体色异常的研究认为,体色异常是由于饲养环境因子的影响,如光照、水温、盐度、底质等^[3-6],以及仔鱼饵料中某些营养成分,如 EPA、DHA、Vitamin A 等的缺失所致^[7-8]。但也有研究表明,在野生环境中生活的鲈类中也存在为数极少的白化现象^[9-10]。还有学者通过雌核发育的苗种和正常培育苗种的饲养对照实验证实^[11],雌核培育苗种的白化率远远高于对照组,并推测营养可能影响基因的表达,某种营养元

素的缺乏,会成为引发体色异常的一个启动子。因此,不能排除遗传因素在鲈类白化病发生中所起的作用。

mtDNA 基因组具有结构简单稳定、母系遗传、进化速度快等特点,因而被作为 1 种重要的分子标记广泛应用于遗传与进化、分子生态学、遗传多样性及其保护等研究领域^[12]。到目前为止,已有一些关于牙鲈的遗传学研究报道^[13-14]。本研究测定分析了养殖褐牙鲈细胞色素 b 基因片段序列,同时对白化、黑化和正常体色鲈序列进行了初步比较,以期为褐牙鲈白化机理研究以及建立高效、健康水产养殖体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2000 年 5 月,取山东省威海海信海珍品有限公司繁育的褐牙鲈幼鱼活体运回实验室,置 -20℃ 以下冷冻保存。用于基因组 DNA 提取及序列测定的样本共 28 尾,其中,白化褐牙鲈 11 尾、黑化褐牙鲈 6 尾、正常褐牙鲈 11 尾(包括购买于青岛四方路鱼市场的褐牙鲈成鱼 2 尾),见图 1。

收稿日期:2002-09-16。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(300705930)。

作者简介:高天翔(1962-),男,教授,博士,从事群体遗传学和渔业生物学方向研究。E-mail: gaozhang@mail.ouc.edu.cn

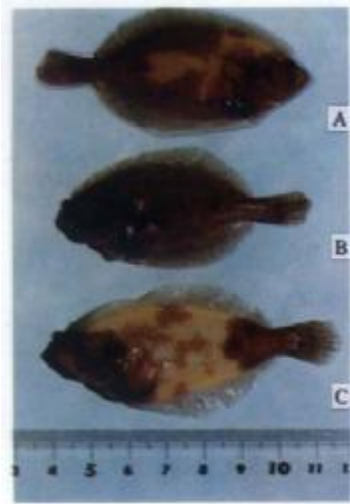


图1 白化(C)、黑化(A)和正常(B)褐牙鲆
Fig. 1 Albino (C), ambicolored (A) and normal (B) Japanese flounder

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 取约0.1g的肌肉组织,采用标准酚/氯仿法提取总DNA^[15]。

1.2.2 PCR扩增 所用Cytb基因引物为Cytb-F: ATGGCAARCTACGAAAAAC, Cytb-R: TGTCTCATGGAAGNACRTA。PCR反应条件为:95℃预变性2min;94℃1min,55℃1min,72℃1min20s,共40个循环;循环结束后,72℃再延伸5min,反应总体积为50μL。PCR产物采用2.5% (质量分数)的琼脂糖(美国FMC公司)电泳,然后用小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)进行回收纯化。

1.2.3 序列测定 以回收纯化产物3~6μL为模板,使用Perkin-Elmer公司的BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit进行测序反应,测序试剂的采用按公司推荐的方法进行。反应产物经Sephadex G-50柱(Sigma公司)纯化、真空干燥和变性后,用ABI公司的377 PRISM全自动DNA序列分析仪进行序列测定分析。

1.2.4 数据处理 DNA序列用DNASTAR软件(DNASTAR Inc.)进行编辑、核对,序列相同视为同一单倍型(Haplotype),分析比较白化褐牙鲆、黑化褐牙鲆和正常褐牙鲆序列。

2 结果

共测定了28尾褐牙鲆mtDNA Cytb基因的部分DNA序列,测得的DNA片段的长度为410bp(图2),其Cytb基因片段410bp序列中A(104bp)、T(119bp)、C(117bp)和G(70bp)的平均含量分别为25.4%、29.0%、28.5%、17.1%,其A+T含量(54.4%)高于C+G含量(45.6%)。

在28个样本的序列中,共检测到3种单倍型(图2)。白化褐牙鲆出现的第1种和第3种单倍型个体数分别为10尾(占白化褐牙鲆样本数的90.91%)和1尾(9.09%);6尾黑化褐牙鲆均出现第1种单倍型(100%);正常褐牙鲆出现的3种单倍型尾数分别为7尾(占正常褐牙鲆样本数的55.56%)、2尾(22.22%)和2尾(22.22%)。3种单倍型间出现了2个C←→T间的转换。

3 讨论

对养殖褐牙鲆Cytb基因序列研究表明,所测得个体间序列无差异或差异极小,且片段长度与其他鱼类相同,其A、T、C、G4种碱基的平均含量也与花鲈等其他鱼类的相同片段序列相似^[16-17]。说明该片段具有很高的同源性,适合于进行种间分子进化遗传分析。经比较得知,本研究测得的序列与已知褐牙鲆序列^[14]之间出现了3处碱基差异,分别位于第6bp、第19bp和第402bp处,是否为褐牙鲆种群间差异以及差异水平如何尚有待进一步研究。

近年,日本学者对北海道和大阪湾的白化雪蟹^[18]和白化梭子蟹^[19]进行了报道,但白化原因尚不清楚。冈本等^[20]还报道了静冈县南伊豆捕获的白化龙虾,并对其蜕皮生长进行了初步研究。结果表明,经2次蜕皮后,该白化龙虾仍是白色的。因此认为其白化并非因饵料环境引起,有可能是由于某种遗传因素致使色素欠缺。除了甲壳类白化个体的报道之外,一些学者对养殖鲷类(如褐牙鲆、大菱鲆等)出现的体色异常现象也开展了大量研究。Seikai等^[21-22]对褐牙鲆的皮肤色素发育过程进行了一系列研究,初步认为白化的发生是由于变态开始后,仔鱼有眼侧皮肤色素形成受阻所致。Seikai等^[23]还对初期饵料及饲养环境对褐牙鲆体色异常的影响作了报道,探讨了白化现象同初期饵料营养的关系;Iwata等^[6]对其黑化现象同光照等饲养环境的关系也进行了研究。对于色素合成的内分泌和神

经调节机制亦有报道^[24]。但关于褐牙鲆白化机制仍是众说纷纭。

在测得序列的3种单倍型中,白化褐牙鲆出现的第1种和第3种单倍型个体数为10尾和1尾;6尾黑化褐牙鲆均出现第1种单倍型;正常褐牙鲆出现的第1、第2、第3种单倍型尾数分别为7尾、2尾、2尾;可以看出,正常褐牙鲆个体遗传多样性较

高于黑化和白化个体。由于 Cytb 基因高度的同源性,白化、黑化和正常褐牙鲆间出现的序列差异现象非常值得进一步研究,如增加样品数量及 DNA 长度,并测定 Cytb 基因以外的多个独立的 mtDNA 基因片段,以及对核基因序列予以补充分析,以找到更适合于褐牙鲆白化机理研究的分子标记。

```

1 ATGGCAAGCCTACGAAAAACACCCCCCTTTAAAAATCGCAAATGATGCATTAGTCGATTTACCAGCCC
2 .....
3 .....
N .....C.....T.....

1 CCTCTAATACTCTGTCTGATGAAACTTTGGGTCCTCTTAGGACTATGTTAATCACCAGATTTTAAC
2 .....
3 .....
N .....

1 CGGCCATTCTTAGCCATACACTACACCTCAGACATCGCAACTGCCTTCACTTCCGTGGCCACATCTGC
2 .....T.....
3 .....C.....
N .....

1 CGGGACGTAACACTACGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCTAACGGGCGCATCTTCTTTATCTGCA
2 .....
3 .....
N .....

1 TTTACCTCCACATCGGCCGAGGCTATACTACGGCTCTTTCTGTATAAAGAAACATGAAATGTTGGCGT
2 .....
3 .....
N .....

1 CATCCTGCTGCTTCTCGTAATGATGACCGCCTTTGTTGGTTACGTCTTCCATGAGGACA
2 .....
3 .....
N .....C.....

```

图2 几种单倍型序列比较

(1、2、3:单倍型1、2、3;N:引自 Saitoh et al, 2000^[14])

Fig. 2 Haplotype comparison of mitochondrial DNA cytochrome b gene among Japanese flounder

(1, 2, 3: haplotypes 1, 2 and 3; N: from Saitoh et al, 2000^[14])

参考文献:

- [1] 陆忠康. 简明中国水产养殖百科全书 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 710 - 717.
- [2] 柳广东, 张秀梅, 高天翔, 等. 山东省威海市褐牙鲆增殖试验研究 [J]. 海洋湖沼通报, 2000, 4: 78 - 82.
- [3] Seikai T, Matsumoto J, Shimozaki M, et al. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Pigm Cell Res*, 1987, 1(3): 143 - 151.
- [4] 孙光. 日本牙鲆人工苗种体色异常的研究现状 [J]. 水产学报, 1988, 12(2): 177 - 181.
- [5] 王涵生. 海水盐度对牙鲆仔稚鱼的生长、存活率及白化率的影响 [J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(4): 399 - 405.
- [6] Iwata N, Kikuchi K. Effects of sandy substrate and light on hypermelanosis of the blind side in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Env Biol Fishes*, 1998, 53: 291 - 297.
- [7] Kanazawa A. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish [J]. *J World Aqu Soc*, 1993, 24: 162 - 164.
- [8] Miki N, Taniguchi T, Hamakawa H, et al. Reduction of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* by feeding on ro-

- tifer enriched with Vitamin A [J]. *Suisanzoshoku*, 1990, 38:147-155.
- [9] Norman J R. A Systematic Monograph of the Flatfishes (*Heterosomata*) [M]. London: British Museum, 1934.
- [10] Gartner J V. Observations on anomalous conditions in some flatfishes, with a new record of partial albinism [J]. *Env Biol Fishes*, 1986, 29: 935-948.
- [11] 田畑和男. ヒラメの白化現象の遺傳的要因の一考察 [J]. 水産増殖, 1991, 39(1): 29-35.
- [12] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化 [J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.
- [13] 尤 锋, 王可玲, 相建海, 等. 山东近海褐牙鲆同工酶的生化遗传分析 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 127-133.
- [14] Saitoh 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.
- [15] 王文, 施立明. 一种改进的动物 DNA 提取方法 [J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 197-198.
- [16] Gao T, Zhang X, Chen D, et al. Study on mitochondrial DNA cytochrome b gene of Chinese sea bass, *Lateolabrax* sp. [J]. *J Ocean Uni Qingdao*, 2001, 2:185-189.
- [17] 青山湖, 小林敬典, 塚本勝巳. ウナギ属 8 種のミトコンドリ
- アDNA シトクロム b 遺伝子による分子系統樹 [J]. 日本水産学会誌, 1996, 62(3): 370-375.
- [18] 村岡健作, 本岡肇. 北海道沖で得た白化のベニズワイガニ [J]. *Cancer*, 1993, 3: 23-25.
- [19] 右山岩之. 大阪湾でとれた白いガザミ [J]. *Cancer*, 1997, 6: 9-10.
- [20] 岡本一利, 御宿昭彦. 静岡県南伊豆で漁獲された白いイセエビとその脱皮成長 [J]. *Cancer*, 1998, 7: 17-18.
- [21] Seikai T. Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during metamorphosis [J]. *Jap J Ichthy*, 1992, 39(1): 85-92.
- [22] Seikai T, Matsumoto J. Mechanism of pseudoalbinism in flatfish: an association between pigment cell and skin differentiation [J]. *J World Aqu Soc*, 1994, 25(1): 78-84.
- [23] Seikai T, Shimozaki M. Influence of three geographically different strains of *Artemia nauplii* on occurrence of albinism in hatchery-reared *Paralichthys olivaceus* [J]. *Bul Jap Soc Sci Fis*, 1987, 53:195-200.
- [24] Estevez A, Kaneko T, Seikai T. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder in relation to albinism [J]. *Aqu*, 2001, 202:131-143.

Sequences of mitochondrial cytochrome b gene of reared *Paralichthys olivaceus*

GAO Tian-xiang^{1,2}, ZHANG Xiu-mei², ZHU Jie², LIU Guang-dong², ZHANG Ya-ping¹

(1. Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266033, China)

Abstract: Twenty-eight samples of reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were used. Among them, 11 were with albinism, 6 with hypermelanosis and the other 11 were at normal state. The partial sequences of their mitochondrial DNA cytochrome b gene were sequenced and analyzed. The sequence length of the target fragments was 410 bp and the contents of A(104 bp), T(119 bp), C(117 bp) and G(70 bp) in the sequence were 25.4%, 29.0%, 28.5% and 17.1%, respectively. Three types of haplotype were observed in the 28 individuals that among the 11 albinotic fish, the first type of haplotype presents in 10 individuals, which makes up 90.91% of the 11, and the third type of haplotype presents in one individual, which makes up 9.09% of the 11. Also, the first type of haplotype exists in all of the 6 melanic fish. But among the 11 normal fish, the first type of haplotype can be observed in 7 individuals (55.56% of normal fish in number), and the second type and the third type of haplotype can be observed in two and two individuals, respectively. Between the sequences obtained and those from Genbank, three sites were different at the positions of 6 bp, 19 bp and 402 bp, respectively. The purpose of this study is to find the molecular marker for the study of albinotic mechanism in *P. olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; cytochrome b; sequence