

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14484

河川沙塘鳢线粒体基因组重排机制及分子标记筛选

李强, 刘至治, 顾迦宁

上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 采用引物步移法 PCR 扩增, 获得全长为 16846 bp 的河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)线粒体全基因组 DNA (mtDNA), 并对其基因结构、重排机制及在系统发育中的应用进行了分析。研究结果: (1) 河川沙塘鳢 mtDNA 由 37 个基因和 1 个非编码控制区组成; 除 *ND6* 和 8 个 tRNA 外, 其他基因都编码在重链(H)上; tRNA 基因因发生滑移重排 (shuffling), 将经典的线粒体基因组 HSL (tRNA^{His}–tRNA^{Ser}–tRNA^{Leu})排列变成了 SLH (tRNA^{Ser}–tRNA^{Leu}–tRNA^{His})排列, 造成在 tRNA^{Leu} 与 tRNA^{His}、*ND4* 与 tRNA^{Ser} 之间分别插入了 320 bp 和 42 bp 的两个“匿名区”。(2) 检测的 112 种鲈形目 (Perciformes) 鱼类中, 仅有 13 种(11.61%)发生了 mtDNA 基因重排现象, 而沙塘鳢属的中华沙塘鳢(*O. sinensis*)、平头沙塘鳢(*O. platycephala*)与河川沙塘鳢的基因重排位置一致, 揭示其可能是沙塘鳢属鱼类进化过程中的一个重要分子“标签”。(3) 筛选得到的两个分子标记 *ND4* 和 *ND5* 基因, 适合用于虾虎鱼亚目(Gobioidei)鱼类阶元水平的系统发育关系的重建。

关键词: 河川沙塘鳢; 线粒体基因组; 基因重排; 分子标记

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2015)05–0858–09

河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)隶属于鲈形目(Perciformes), 虾虎鱼亚目(Gobioidei), 沙塘鳢科(Odontobutidae), 沙塘鳢属。它是一种小型底栖淡水鱼类, 在长江流域分布广泛, 肉质鲜美, 深受大众喜爱^[1]。近年来, 沙塘鳢的繁殖与养殖在安徽、江苏等地竞相开展^[2–3]。不过, 由于沙塘鳢属鱼类具有高度相似的表型, 关于沙塘鳢属鱼类的分类, 在学术上存在争议, 长期以来河川沙塘鳢一直被误鉴为仅分布于日本的暗色沙塘鳢(*O. obscura*)。直到 1993 年, 伍汉霖等^[4]通过鱼体头部感觉管孔 C 的有无和头部感觉乳突排列方式的差异性, 成功将二者进行区分。然而, 迄今有关河川沙塘鳢分子生物学研究的报道仍然较少^[5], 这不利于沙塘鳢养殖业的健康持续发展。

研究表明, 线粒体基因组因其结构简单、核酸序列和组成比较保守等特点, 已成为探讨鱼类分子起源进化、物种鉴定等的较可靠遗传标记^[6–7]。

本研究拟对河川沙塘鳢线粒体基因组全序列进行扩增与结构分析, 并结合 GenBank 上获得的虾虎鱼亚目代表性鱼类的线粒体基因组全序列数据, 探讨沙塘鳢属鱼类线粒体基因组的基因重排机制, 期望获得系统发育信息质量较高的分子标记, 既为沙塘鳢属鱼类的物种界定和遗传多样性研究提供基础资料, 又为虾虎鱼亚目鱼类的分子系统发育关系的重建提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本收集

河川沙塘鳢于 2013 年 3 月采自安徽宣城水阳江, 采用“苯酚–异戊醇–氯仿”法提取基因组 DNA^[8], 检测后的 DNA 保存于–20℃冰箱, 以用于扩增线粒体基因组(mtDNA)。同时, 从 GenBank 中下载所需的其他虾虎鱼亚目鱼类 mtDNA 序列(表 1)。

收稿日期: 2014-11-20; 修订日期: 2014-12-24.

基金项目: 上海市自然科学基金项目(14ZR1420400); 上海高校水产一流学科建设项目.

作者简介: 李强(1989–), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类分子系统进化. E-mail: tssylq2010@126.com

通信作者: 刘至治, 副教授. Tel: 021-61900425; E-mail: zzliu@shou.edu.cn

表 1 部分鲈形目鱼类线粒体基因组信息
Tab.1 Mitochondrial genome information from part of the Perciformes

中文名 Chinese name	拉丁名 Latin name	分类地位 taxonomic status	GenBank 号 GenBank no.
小黄黝鱼	<i>Micropercops swinhonis</i>	沙塘鳢科 Odontobutidae	KF040334
平头沙塘鳢	<i>Odontobutis platycephala</i>	沙塘鳢科 Odontobutidae	NC010199
中华沙塘鳢	<i>Odontobutis sinensis</i>	沙塘鳢科 Odontobutidae	KF154120
葛式鲈塘鳢	<i>Percottus glenii</i>	塘鳢科 Eleotridae	NC020350
溪鳢	<i>Rhyacichthys aspro</i>	溪鳢科 Rhyacichthyidae	NC004414
中华乌塘鳢	<i>Bostrychus sinensis</i>	塘鳢科 Eleotridae	NC017880
塘鳢	<i>Eleotris acanthopoma</i>	塘鳢科 Eleotridae	NC004415
大弹涂鱼	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	弹涂鱼科 Periophthalmidae	JN631352
平头竿虾虎鱼	<i>Luciogobius platycephalus</i>	虾虎鱼科 Gobiidae	JX971538

1.2 河川沙塘鳢 mtDNA 的 PCR 扩增与测序

首先, 根据 Mabuchi 等^[9]报道的鱼类通用引物扩增 mtDNA 部分序列, 剩余基因序列通过引物步移得到。反应模板 DNA 约为 100 ng, 25 μL 反应体系包括: Ex Taq 酶 0.25 μL (2 U), 10×Ex Taq Buffer 2.5 μL, dNTPs 1 μL(各 2.5 mmol/L), 引物各 0.5 μL (20 μmol/L)。PCR 反应程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s(退火温度依特定引物), 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由上海生工生物技术服务有限公司纯化, 用 ABI3770XL 自动测序仪进行 Sanger 法双向测序。

1.3 全序列的拼接与注释

通过 NCBI BLAST 检索, 确定所得序列与 GenBank 中所收录的沙塘鳢属鱼类 mtDNA 相应区段有较高序列相似性后, 利用测序峰图结果分析软件 DNA Baser V3.5.4 (<http://www.dnabaser.com/news/index.html>) 和 Contig Express^[10], 将所有片段拼接成一个完整的 mtDNA, 辅以人工校正。用 Editseq 7.1^[10]和 Mega 5.0^[11]统计序列总长、碱基组成和 AT 含量等信息; 用在线软件 tRNAscan-SE 1.21^[12]进行 tRNA 基因定位并对二级结构进行预测, 并辅助人工校正, 对于 tRNA scan-SE 1.21 未能预测的 tRNA, 则采用 RNA structure 4.6^[13]预测茎环结构。mtDNA 全序列经 MitoFish^[14]注释后, 提交 GenBank(KF874495), 用 DNAMAN^[15]和 Geneious v.5.4^[16]构建河川沙塘鳢 mtDNA 结构简图。

1.4 选择压力分析

一般情况下, 基因的进化速率受到纯化(负)选择、突变和定向(正)选择等因素控制。为了检验选择压力对虾虎鱼亚目类群 mtDNA 的影响, 通过 Geneious v.5.4 对所得序列进行严格多重序列比对分析, 然后利用 DnaSP 5.0^[17]与 PAML^[18]软件, 估算其非同义替换率(K_a)和同义替换率(K_s)的比值(K_a/K_s)。

1.5 基因差异性分析

对表 1 中 9 种虾虎鱼亚目鱼类及河川沙塘鳢的 mtDNA 蛋白编码基因进行基因变异位点分析。先通过 Geneious v.5.4 软件, 比对 10 种虾虎鱼亚目鱼类的蛋白编码基因, 然后利用 DnaSP 5.0 软件分析这些蛋白编码基因的变异位点与变异特征。

1.6 系统发育学分析

结合文献[19–20]及选择压力分析与基因差异性分析结果, 选择备选分子标记基因。先利用 Geneious v.5.4 对所选基因序列进行严格多重序列比对分析, 再以 jModel Test 2^[21]评估所有位点的最适置换进化模型, 并以 AIC (Akaike information criterion)参数值评价所选模型的优劣。通过 Neighbor-joining 方法构建先验基因树, 用 Geneious v.5.4 和 Mega v.5.0 进行最大似然法(Maximum Likelihood, ML)系统发育分析, 自举支持度值(bootstrap analysis)取 1 000。

2 结果与分析

2.1 河川沙塘鳢 mtDNA 的基因组结构

河川沙塘鳢 mtDNA 全长 16846 bp (GenBank

序列号: KF874495), 基因组成与典型的脊椎动物 mtDNA 相似, 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 基因和非编码区(O_L 区和 D-loop 区) (图 1)。分析显示, Gln、Ala、Asn、Cys、Tyr、Ser、Glu 和 Pro 8 个 tRNA 及 ND6 基因编码在轻链(L 链)上, 其他基因则编码在重链(H 链)上。

2.2 河川沙塘鳢 mtDNA 的特异性

2.2.1 核苷酸组成、结构与特征 河川沙塘鳢 mtDNA 的 4 种碱基 A、T、C、G 的含量分别为 26.3%、28.3%、29.0%、16.4%, 其“A+T”(55.3%)

含量高于 “G+C”(46.7%), 具有 A-T 偏好性与明显的反 G 偏倚现象。12S rRNA 与 16S rRNA 基因位置固定, 基因组成与长度差异性都很小, 高度保守, 进化速度很慢。蛋白编码基因总长为 10575 bp, 占全长的 62.77%; 除 CO I 和 ATPase6 基因的起始密码子分别为 GTG 与 ATA 外, 其余 11 个均以 ATG 起始。终止密码子有 3 种, 分别为完全终止密码子 TAA 以及两种不完全终止密码子 TA 与 T。河川沙塘鳢 mtDNA 的非编码区主要有未知意义插入的片段和控制区, 其中控制区长 849 bp, 位于 tRNA^{Pro} 与 tRNA^{Phe} 之间。

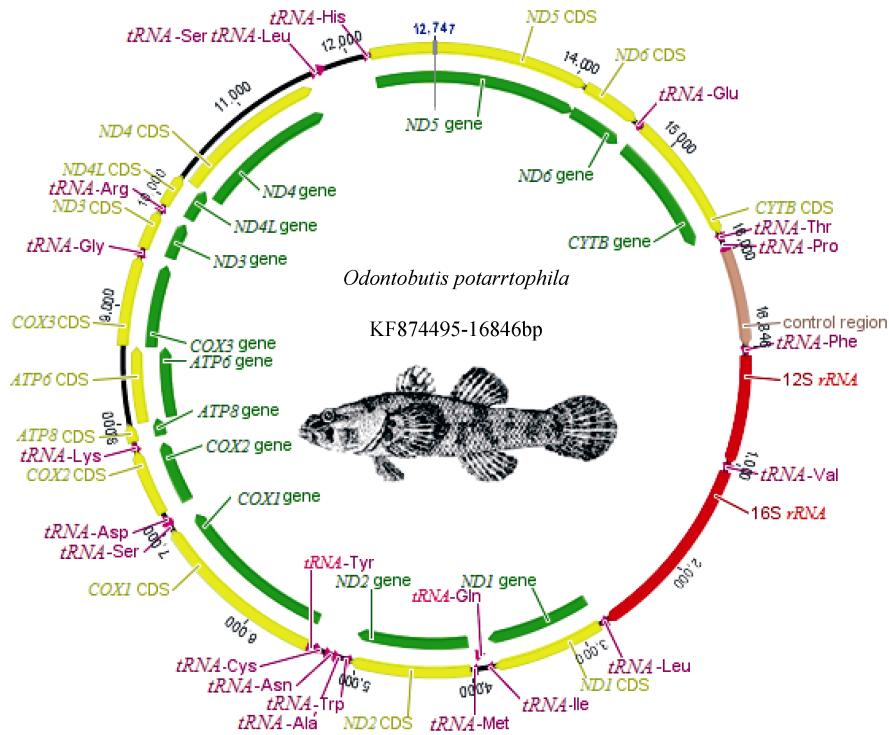


图 1 河川沙塘鳢 mtDNA 全序列简图

Fig. 1 Gene organization of *Odontobutis potamophila* mitochondrial genome

2.2.2 tRNA 基因结构与基因重排现象分析 22 个 tRNA 基因长度在 67~73 bp, 结构均呈典型的“三叶草”型。分析发现, 河川沙塘鳢 mtDNA 基因组发生了滑移重排(shuffling)现象(图 2), 导致 tRNA^{His} 滑移到 tRNA^{Leu} 的 3' 端, 将经典的线粒体基因组 HSL (tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}) 排列变成了 SLH (tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu}-tRNA^{His}) 排列, 造成 tRNA^{Leu} 与 tRNA^{His}、ND4 与 tRNA^{Ser} 之间分别插入了长度为 320 bp 与 42 bp 的“匿名区”

(anonymous regions); 另在 WANCY (tRNA^{Trp}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Asn}-tRNA^{Cys}-tRNA^{Tyr}) 的 tRNA^{Asn}-tRNA^{Cys} 之间插入了 34 bp 的另一“匿名区”。经比较发现, 先前报道的河川沙塘鳢 mtDNA 基因组 (GenBank 序列号: NC_022706 或 KF305680, 实为同一序列), 与本序列的相似度为 99%, 且二者基因结构及重排方式完全一致, 揭示河川沙塘鳢 mtDNA 基因组的滑移重排现象并非个体间差异造成。

截至 2014 年 11 月 10 日, GenBank 基因库中现有鲈形目鱼类线粒体基因组全长序列 112 条。通过比较, 发现其中的 13 种鱼类(11.61%)发生了线粒体基因组重排现象, 有滑移和移位两种类型,

均属基因重组的模式(表 2)。特别是沙塘鳢属的 3 种鱼类, 都发生了“滑移”重排现象(表 2), 揭示这种重排可能是该属鱼类进化过程中一个重要的分子“标签”。

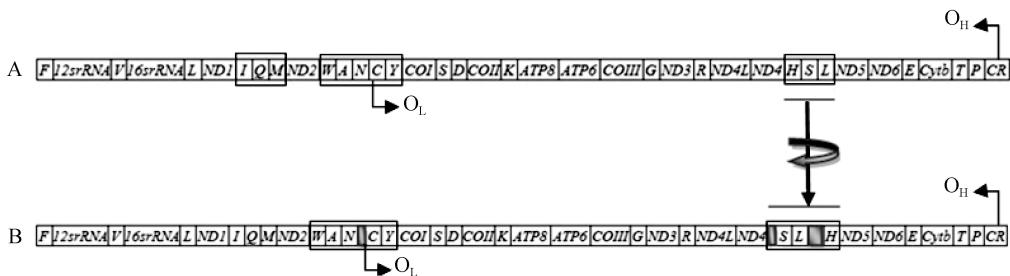


图 2 鲈形目(A)与河川沙塘鳢(B)线粒体基因组排列方式比较

O_L 为轻链复制起始区, O_H 为重链复制起始区。

Fig. 2 Arrangement comparison among complete mitochondrial genomes from Perciformes (A) and *Odontobutis potamophila* (B). O_L and O_H stand for replication origin of light chain and heavy chain, respectively.

表 2 鲈形目鱼类线粒体基因组重排信息

Tab. 2 Rearrangement information of mitochondrial genomes from the Perciformes

中文名 Chinese name	拉丁名 Latin name	分类地位 taxonomic status	mtDNA 重排类型 rearrangement type	GenBank 号 GenBank no.
平头沙塘鳢	<i>Odontobutis platycephala</i>	沙塘鳢科 Odontobutidae	滑移 shuffling	NC010199
河川沙塘鳢	<i>Odontobutis potamophila</i>	沙塘鳢科 Odontobutidae	滑移 shuffling	KF874495
中华沙塘鳢	<i>Odontobutis sinensis</i>	沙塘鳢科 Odontobutidae	滑移 shuffling	KF154120
细棘海猪鱼	<i>Halichoeres tenuispinis</i>	隆头鱼科 Labridae	移位 translocation	NC011191
宝石低纹鮨	<i>Hypoplectrus gemma</i>	鮨科 Serranidae	移位 translocation	NC013832
侧纹南极鱼	<i>Pleuragramma antarctica</i>	南极鱼科 Notothenioidei	移位 translocation	NC015652
斑点叉尾鮰	<i>Ictalurus punctatus</i>	鮰科 Amblycipitidae	移位 translocation	NC014353
裸盖鱼	<i>Dissostichus eleginoides</i>	黑鮟鱇科 Anoplopomatidae	移位 translocation	NC018135
南极冰鱼	<i>Chionodraco myersi</i>	鳕冰鱼科 Channichthyidae	移位 translocation	NC010689
南极鳕	<i>Notothenia coriiceps</i>	鳕鱼科 Gadidae	移位 translocation	NC015653
史氏鹦哥鱼	<i>Scarus schlegeli</i>	鹦哥鱼科 Scaridae	滑移 shuffling	NC0111936
条纹粗眼鮀	<i>Trachinops taeniatus</i>	七夕鱼科 Plesiopidae	滑移 shuffling	NC017900
白斑鹦哥鱼	<i>Chlorurus sordidus</i>	鹦哥鱼科 Scaridae	滑移 shuffling	AP006567

2.2.3 选择压力分析 对 10 种虾虎鱼亚目鱼类 mtDNA 的 13 个蛋白编码基因的选择压力进行分析的结果表明, 它们的 K_a/K_s 值介于 0.1242~0.6926, 都小于 1.0000, 显示出较强的负向选择作用。然而, 这些蛋白编码的基因中(图 3), 有的基因如 *ND4*、*ND6* 和 *ND5* 的 K_a/K_s 值较大(0.6026、0.5923 与 0.4051), 有的基因如 *ND4L* 与 *CO III* 的 K_a/K_s 值(0.1242 和 0.1378)却很小, 表明不同蛋白编码基因所承受的选择压力强弱不同。

2.2.4 基因变异位点分析与分子标记筛选 在进行不同遗传水平的种群遗传差异研究时, 选择合适的遗传标记至关重要。对 9 种虾虎鱼亚目鱼类与河川沙塘鳢的基因变异位点进行分析的结果表明(表 3), *ND3* 与 *Cyt b* 保守性最高, 变异率分别为 22.35% 与 23.5%; *ND6*、*CO II*、12S rRNA、16S rRNA、*CO I*、*CO III*、*ND1*、*ND4L*、*ATP6* 与 *ND5* 等基因的变异率介于 30%~50%; *ND4*、*ND2* 与 *ATP8* 等基因的变异率介于 50%~70%, 而其中 *ATP8* 与

ND2 基因的位点变异率最高, 分别为 61.31% 与 57.18%。这些基因中, *ND5* 与 *ND4* 的变异位点数最多, 分别为 970 个与 699 个(表 3), 变异位点比率则分别为 49.74% 和 50.47%, 且这两个基因的 K_a/K_s 值也较大(图 3), 表明它们为合适的备选分子标记, 可用于科阶元水平的虾虎鱼群体遗传学研究。

2.3 系统发育分析

利用 ML 法, 基于蛋白编码基因 *ND4* 和 *ND5*, 分别构建虾虎鱼亚目 10 种鱼类的系统发育聚类关系树。结果发现, 分别以蛋白编码基因 *ND4* 和 *ND5* 聚类的结果一致(图 4 仅显示 *ND4* 基因的系统发育树)。可以看出, 中华沙塘鳢与平头沙塘鳢(*O. platycephala*)最先聚成一支, 再与河川沙塘鳢

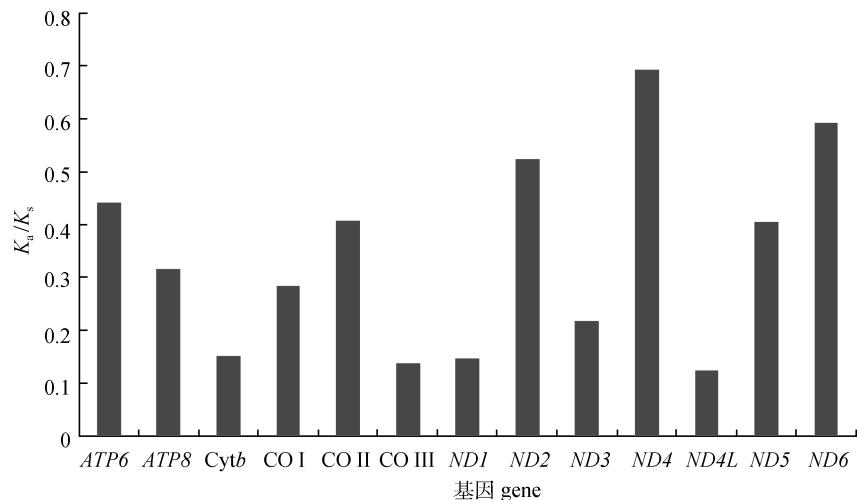


图 3 虾虎鱼亚目各蛋白质编码基因 K_a/K_s 值比较

K_a/K_s 表示非同义替换率 K_a 和同义替换率 K_s 的比值.

Fig. 3 Comparison of K_a/K_s ratio in mitochondrial protein genes of Gobioidei
 K_a/K_s stands for the ratio between non-synonymous substitution rate (K_a) and synonymous substitution rate (K_s).

表 3 虾虎鱼亚目鱼类线粒体基因组 13 个蛋白编码基因和 2 个核糖体 RNA 基因变异位点的比较
Tab. 3 Comparison of variation loci for the 13 protein-coding genes and 2 rRNA genes in Gobioidei mtDNA

基因 gene	总位点数 no. of sites	不变位点 monomorphic site	变异位点 polymorphic site	缺失位点 missing site	单现突变 singleton variable site	简约位点 parsimony informative site	变异位点比例/% ratio of variable sites
ATP6	687	360	321	6	71	250	46.72
ATP8	168	62	103	3	37	66	61.31
Cyt b	1143	603	527	13	132	395	23.50
CO I	1555	965	585	9	735	499	37.62
CO II	695	460	222	13	63	159	31.94
CO III	837	492	340	5	108	232	40.62
ND1	979	562	412	5	111	301	42.08
ND2	1051	438	601	12	164	437	57.18
ND3	349	268	78	3	20	58	22.35
ND4	1385	683	699	3	180	519	50.47
ND4L	297	162	135	0	34	101	45.45
ND5	1950	968	970	12	228	742	49.74
ND6	542	355	165	4	200	237	30.44
12S rRNA	970	604	316	50	110	206	32.58
16S rRNA	1727	999	601	127	206	395	34.80

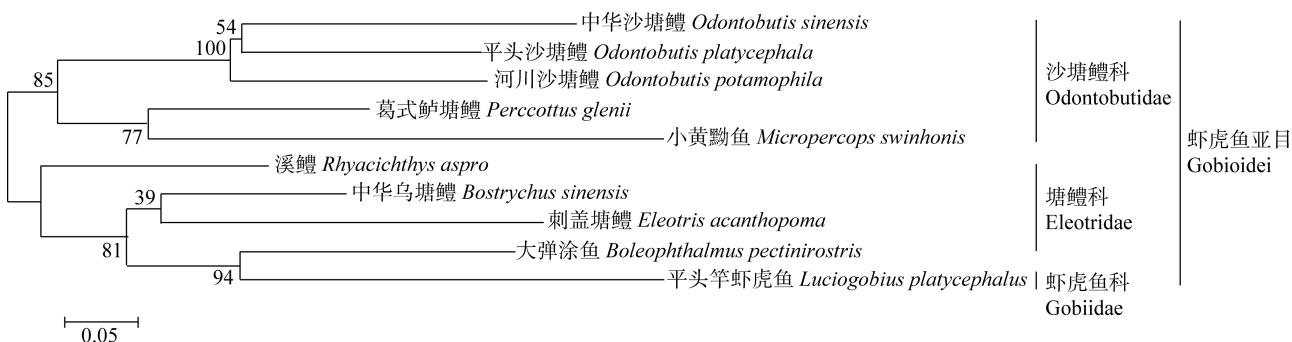


图4 基于蛋白编码基因ND4构建的虾虎鱼亚目鱼类的ML系统发育树

自举支持度值为1 000, 0.05表示系统发育树进化标尺.

Fig. 4 Phylogenetic tree of Gobiodei based on ND4 gene by ML method
Numbers of bootstrap replicates is 1 000; 0.05 is the evolution scale of phylogenetic tree.

(*O. potamophila*)聚类, 呈现出沙塘鳢属鱼类间的进化关系; 葛式鲈塘鳢(*Percottus glenii*)与小黄黝鱼(*Micropercops swinhonis*)组成另外一个分支, 然后与沙塘鳢属鱼类一起组成沙塘鳢科的一大支; 另外, 虾虎鱼科的平头竿虾虎鱼与大弹涂鱼先聚类, 中华乌塘鳢与刺盖塘鳢聚类, 然后这两个分支聚在一起, 再与溪鳢聚类; 最后, 两大支聚在一起形成了虾虎鱼亚目分子系统进化关系。需特别指出的是, 这一聚类结果与利用同样10种鱼类的线粒体基因组全序列构建的系统发育树(此处未列出)一致, 从而进一步证明ND4和ND5为两个良好分子标记。可见, 沙塘鳢属鱼类与葛式鲈塘鳢关系较近, 与其他塘鳢科或虾虎鱼科鱼类关系较远。

3 讨论

3.1 河川沙塘鳢 mtDNA 基因的结构特征

分析表明, 河川沙塘鳢 mtDNA 基因组成与大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)^[22]、葛式鲈塘鳢^[23]等脊椎动物相一致, 符合典型脊椎动物的 mtDNA 基因组成方式。然而, 本研究表明, 河川沙塘鳢的 mtDNA 基因组织不够紧凑, 其核苷酸组成有明显的“A-T”偏好性。有研究者认为, 这种现象可能与线粒体细胞器中含有大量的 ATP 有关^[24]。虽然河川沙塘鳢的密码子第3位较强的G排斥性在 mtDNA 基因组与蛋白编码基因中都存在, 但22个 tRNA 组成却不存在这种反 G 偏倚现象; 类似的情况在大弹涂鱼^[22]、圆斑星鲽(*Verasper*

variegatus)^[25]、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)^[26]及尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[27]等鱼类的 mtDNA 组成中均得到证实, 推测可能是由于这些鱼类 mtDNA 的8个 tRNA 编码在L链上的缘故。另外, 蛋白编码基因核苷酸组分分析显示, 密码子的变化往往来源于核苷酸碱基的改变, 而对应的氨基酸产物并未发生变化。张晓梅等^[28]认为, 这种现象可能是在高进化速度情况下, 线粒体维持蛋白质结构与功能稳定性的一种“过渡方式”。

3.2 关于鱼类 mtDNA 基因重排机制的探讨

研究表明, 鱼类 mtDNA 基因重排主要有3种机制, 即滑移(shuffling)^[29]、移位(translocation)^[30]和倒置(inversion)^[31]。本研究发现, 鲈形目鱼类 mtDNA 基因重排机制主要体现在滑移和移位两方面。首先, 若 mtDNA 基因发生滑移重排, 其位点主要在 HSL (tRNA^{His}-tRNA^{Ser}-tRNA^{Leu})、IQM (tRNA^{Ile}-tRNA^{Gln}-tRNA^{Met})与 WANCY (tRNA^{Trp}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Asn}-tRNA^{Cys}-tRNA^{Tyr})这3个基因簇间^[29]。本研究分析表明, 鲈形目鱼类 mtDNA (表3)的基因重排机制不同, 例如, 平头沙塘鳢、中华沙塘鳢与河川沙塘鳢的重排位点位于 HSL 基因簇, 将典型的 HSL 基因排列滑移成 SLH 结构; 史氏鹦哥鱼与白斑鹦哥鱼重排发生于 IQM 基因位点, 将典型的 IQM 滑移成 IMQ 结构; 而条纹粗眼鮗与细棘海猪鱼却将典型的 WANCY 基因排布滑移成了 WNACY。

其次, 许多研究证实, 移位重排可以发生于

mtDNA 蛋白编码基因区域、tRNA 基因区域或控制区，也可以同时发生于两个或两个以上区域，但主要是几种类型的复合作用：(1)mtDNA 蛋白编码基因的移位重排。例如，光蟾鱼(*Porichthys myriaster*) *ND2* 与 *CO I* 基因移位到了 *ND4* 与 *ND6* 之间^[32]。本研究发现侧纹南极鱼(*Pleuragramma antarctica*)、斑点叉尾鮰(*Lethrinus punctatus*)、裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)、南极冰鱼(*Chionodraco myersi*)与南极鳕(*Notothenia coriiceps*)等不同鱼类都发生了 *ND6* 和 tRNA^{Glu} 基因移位到控制区和 tRNA^{Phe} 间的重排现象。(2)tRNA 基因移位重排。例如，纤钻光鱼(*Gonostoma gracile*)的 tRNA^{Glu} 移位至 *Cyt b* 基因的 3' 端，同时伴随着 tRNA^{Thr} 和 tRNA^{Pro} 基因的互换^[33]；月尾鳗(*Cyema atrum*)的 tRNA^{Ile} 移位至 tRNA^{Phe} 与 12S rRNA 之间^[30]。(3) 控制区发生移位重排。据 Miya 等^[31]报道，毛杜父鱼(*Clinocottus analis*)、密刺角鮨鱈(*Cryptopsaras couesi*)等物种都发生了 mtDNA 控制区不同程度的移位现象。研究也发现，这种滑移或移位重排现象可能是由于线粒体内的基因重组造成的^[34]。

最后，基因倒置现象在现有鲈形目鱼类 mtDNA 基因组中虽然没有发现，但这种现象在蝶形目鱼类如日本须鲷(*Paraplagusia japonica*)^[29]与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[35]的 mtDNA 中均有发现。然而，鲈形目鱼类种类众多、数量非常庞大，随着研究范围的日益扩大，或许能发现某些鱼类存在类似的基因倒置现象。

有研究者认为，复杂的共享衍生基因排列，更有可能是不同种类的鱼类具有共同祖先的结果，因而线粒体基因重排可作为一个显著的“进化信号”^[36]。然而，生物体的生活环境对重排现象的形成是否会产生影响，在同一谱系中，基因重排频率与序列进化速度的互作关系，即碱基的替换速度对基因排布方式的潜在影响是怎样的，以及如何将这种包含大量遗传分化与系统发育的重要进化信息利用在系统发生的重建中，是当前线粒体基因组研究亟待解决的问题。

致谢：在研究过程中，李晨虹教授及硕士研究生

旷婷与李景艳同学协助采集沙塘鳢样品，数据分析中得到张天睿与苏丽维的帮助，在此一并致谢！

参考文献：

- [1] Wu H L, Zhong J S. Taxonomic Research of the Gobioidei (Perciformes) in China[M]. Beijing: Science Press, 2008: 150–153. [伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志硬骨鱼纲鲈形目(五)虾虎鱼亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 150–153.]
- [2] Yang C G, Wang Y L, Song X H, et al. Artificial breeding and fish breeding test of *Odontobutis potamophila*[J]. Reservoir Fisheries, 2005, 25(6): 49, 112. [杨彩根, 王永玲, 宋学宏, 等. 沙塘鳢人工繁殖及鱼苗培育试验[J]. 水利渔业, 2005, 25(6): 49, 112.]
- [3] Jiang Y F, Wang X Y, Shi J G. Technology exploration of pond farming for *Odontobutis yaluensis*[J]. Fishery Guide to be Rich, 2007(20): 45–46. [蒋云峰, 王小一, 史建国. 鸭绿沙塘鳢的池塘养殖技术初探[J]. 渔业致富指南, 2007(20): 45–46.]
- [4] Wu H L, Wu X Q, Xie Y H. A revision of the genus *Odontobutis* from China with description of a new species[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1993, 2(1): 52–61. [伍汉霖, 吴小青, 谢玉浩. 中国沙塘鳢属鱼类的整理和一新种的叙述[J]. 上海水产大学学报, 1993, 2(1): 52–61.]
- [5] Ren G, Zhang Q. Molecular phylogeny of the genus *Odontobutis* based upon partial sequences of mitochondrial 12S rRNA genes[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(4): 473–477. [任岗, 章群. 中国沙塘鳢属鱼类线粒体 12S rRNA 基因序列分析[J]. 水生生物学报, 2007, 31(4): 473–477.]
- [6] Botero-Castro F, Tilak M K, Justy F, et al. Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae)[J]. Mol Phylogenetic Evol, 2013, 69(3): 728–739.
- [7] Pabijan M, Wandycz A, Hofman S, et al. Complete mitochondrial genomes resolve phylogenetic relationships within *Bombina* (Anura: Bombinatoridae)[J]. Mol Phylogenetic Evol, 2013, 69(1): 63–74.
- [8] Zeng Z, Liu Z Z, Pan L D, et al. Analysis of genetic diversity in wild populations of *Trachidermus fasciatus* by RAPD and the transformation of two SCAR markers[J]. Zoological Research, 2012, 33(2): 203–210. [曾珍, 刘至治, 潘连德, 等. 松江鲈鱼野生群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化[J]. 动物学研究, 2012, 33(2): 203–210.]
- [9] Mabuchi K, Miya M, Senou H, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of the Lake Biwa wild strain of common carp (*Cyprinus carpio* L.): further evidence for an-

- cient origin[J]. Aquaculture, 2006, 257(1–4): 68–77.
- [10] Yue G H, Liew W C, Orban L. The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, *Osteoglossidae*)[J]. BMC Genom, 2006, 7: 242–254.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [12] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25(5): 955–964.
- [13] Mathews D H. RNA secondary structure analysis using RNA structure[M]. Current Protocols in Bioinformatics. John Wiley & Sons, Inc, 2006, 12: Unit 12.6.
- [14] Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, et al. MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(11): 2531–2540.
- [15] Pearson W R. Comparison of methods for searching protein sequence databases[J]. Protein Sci, 1995, 4(6): 1145–1160.
- [16] Drummond A J, Ashton B, Buxton S, et al. Geneious v.5.4[CP/OL]. <http://www.geneious.com>.
- [17] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [18] Yang Z H. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1586–1591.
- [19] Zardoya R, Axel M. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates[J]. Mol Biol Evol, 1996, 13(7): 933–942.
- [20] Tian M, Shen X, Meng X P, et al. Comparison of mitochondrial genomes and genetic variation loci of seven starfish[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2012, 31(2): 189–194. [田美, 申欣, 孟学平, 等. 7个海星动物线粒体基因组比较及基因变异位点分析[J]. 台湾海峡, 2012, 31(2): 189–194.]
- [21] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, et al. jModel Test 2: more models, new heuristics and parallel computing[J]. Nat Methods, 2012, 9: 772.
- [22] Liu Z Z, Wang C T, Ma L B, et al. Complete mitochondrial genome of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Perciformes, Gobiidae): Repetitive sequences in the control region[J]. Mitochondrial DNA, 2012, 23(1): 31–33.
- [23] Xue W, Hou G Y, Li C Y, et al. Complete mitochondrial genome of Chinese sleeper, *Percottus glenii*[J]. Mitochondrial DNA, 2013, 24 (4): 339–341.
- [24] Minde U D P, Sorenson M D, Dimcheff D E. An extra nucleotide is not translated in mitochondrial of some birds and turtles[J]. J Mol Evol, 1998, 15: 1568–1571.
- [25] He C B, Gao X G, Wang X M, et al. Structure and evolution of complete mitochondrial genome of spotted halibut *Verasper variegatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(4): 584–592. [赫崇波, 高祥刚, 王效敏, 等. 圆斑星鲽线粒体基因组全序列结构及其进化[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 584–592.]
- [26] Liu S F, Wu R X, Zhu L, et al. Complete sequence and gene organization of mitochondrial DNA of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 885–893. [柳淑芳, 吴仁协, 朱玲, 等. 小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)线粒体基因组结构与特征[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 885–893.]
- [27] Yang L P, Lu M X, Ye X, et al. Complete mitochondrial genome DNA of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and phylogenetic analysis[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 26(5): 484–490. [杨丽萍, 卢迈新, 叶星, 等. 尼罗罗非鱼线粒体基因组全序列测定与系统进化分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(5): 484–490.]
- [28] Zhang X M, Shan X N, Shi Y F, et al. Sequence and organization of *Muntiacus reevesi* mitochondrial genome[J]. Hereditas, 2004, 26(6): 849–853. [张晓梅, 单祥年, 施燕峰, 等. 小麇线粒体基因组全序列的测定和分析[J]. 遗传, 2004, 26(6): 849–853.]
- [29] Gong L, Shi W, Wang Z, et al. Control region translocation and a tRNA gene inversion in the mitogenome of *Paraplagusia japonica* (Pleuronectiformes: Cynoglossidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2013, 24(6): 671–673.
- [30] Inoue J G, Miya M, Miller M J, et al. Deep-ocean origin of the freshwater eels[J]. Biol Lett, 2010, 6(3): 363–366.
- [31] Miya M, Pietsch T W, Orr J W, et al. Evolutionary history of anglerfishes (Teleostei: Lophiiformes): a mitogenome perspective[J]. BMC Evol Biol, 2010, 10(1): 58.
- [32] Miya M, Satoh T P, Nishida M. The phylogenetic position of toadfishes (order Batrachoidiformes) in the higher ray-finned fish as inferred from partitioned Bayesian analysis of 102 whole mitochondrial genome sequences[J]. Biol J Linnean Soc, 2005, 85(3): 289–306.
- [33] Miya M, Nishida M. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes[J]. Mar Biotechnol, 1999, 1(5): 416–426.
- [34] Poulton J, Deadman M E, Bindoff L, et al. Families of mtDNA re-arrangements can be detected in patients with

- mtDNA deletions: duplications may be a transient intermediate form[J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(1): 23–30.
- [35] Kong X Y, Dong X L, Zhang Y C, et al. A novel rearrangement in the mitochondrial genome of tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*: control region translocation and a tRNA gene inversion[J]. Genome, 2009, 52(12): 975–984.
- [36] Yi S V. Understanding neutral genomic molecular clocks[J]. Evol Biol, 2007, 34(3–4): 144–151.

Mitochondrial gene rearrangement and molecular marker selection for *Odontobutis potamophila*

LI Qiang, LIU Zhizhi, GU Jianing

Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The river sleeper, *Odontobutis potamophila* (Perciformes, Odontobutidae), is a small demersal freshwater goby and has recently been considered a promising candidate for aquaculture in China. However, until now there has been limited genetic information regarding *O. potamophila*. In this paper, the complete mitochondrial genome (mtDNA) of *O. potamophila* was obtained by primer-walking PCR amplification, and the mtDNA length was 16846 bp. Then, mtDNA structure, gene rearrangement mechanism, and application in phylogenetic reconstruction were analyzed. The mtDNA of *O. potamophila* contained 37 genes (13 protein-coding genes, two rRNAs, and 22 tRNAs) and non-coding control regions. In addition to *ND6* and eight tRNAs (tRNA^{Gln}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Glu}, and tRNA^{Pro}), all other components were encoded on the heavy strand. All protein-coding genes initiated with the typical ATG sequence except CO I (with GTG) and *ATP6* (with ATA). These 13 protein-coding genes had TAA, TA-, and T- as termination codons. Because of shuffling rearrangement of different tRNAs, the classic mtDNA arrangement HSL (tRNA^{His}–tRNA^{Ser}–tRNA^{Leu}) changed into SLH (tRNA^{Ser}–tRNA^{Leu}–tRNA^{His}). Consequently, 320 bp and 42 bp anonymous regions were inserted between tRNA^{Leu} and tRNA^{His}, and between *ND4* and tRNA^{Ser}, respectively. However, the content of A+T (55.3%) was higher than that of G+C (46.7%), and it was similar to other fish mtDNA. Among the 112 analyzed Perciforme fish species, only 13 (11.61%) experienced mtDNA gene rearrangement. In particular, the gene rearrangement of *O. potamophila* (KF874495) was similar to that of *O. platycephala* (NC010199) and *O. sinensis* (KF154120), which indicates that this is an important molecular ‘tag’ for the evolution of the *Odontobutis*. Selection pressure and genetic diversity analyses of the 13 protein-coding genes revealed that *ND4* and *ND5* might be suitable molecular candidate markers for reconstructing phylogenetic relationships in the Gobioidei family. In the ML phylogenetic tree for 10 species of Gobioidei based on *ND4* or *ND5* gene, the three *Odontobutis* species were most closely related to *Percottus glenii*, and this was consistent with traditional morphological classification.

Key words: *Odontobutis potamophila*; mitochondrial genome; gene arrangement; molecular marker

Corresponding author: LIU Zhizhi. E-mail: zzliu@shou.edu.cn