

3种白鲑线粒体细胞色素b和16S rRNA基因片段序列分析

张俊丽¹, 高天翔¹, 韩志强¹, 郭焱², 董崇智³

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 新疆维吾尔自治区水产研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:对黑龙江水域的乌苏里白鲑(*Coregonus ussuriensis*)和由俄罗斯引种的贝加尔凹目白鲑(*C. autumnalis migratorius*)和高白鲑(*C. peled*)的线粒体细胞色素b(Cyt b)和16S rRNA基因片段进行了扩增和序列测定, 分析比较了3种白鲑间的序列差异。在402 bp的Cyt b基因片段中, 3个乌苏里白鲑个体中出现了2种单倍型, 种内个体间有2个碱基的差异, 而贝加尔凹目白鲑和高白鲑的个体各出现1种单倍型; 在577 bp的16S rRNA基因片段中, 3个乌苏里白鲑个体出现了2种单倍型, 种内个体间存在1个碱基的差异, 而贝加尔凹目白鲑和高白鲑2个种的序列完全相同。研究结果表明, Cyt b基因适用于白鲑的分子系统发育研究。基于Cyt b基因片段序列, 利用Kimura-2模型构建的NJ树表明: 乌苏里白鲑与贝加尔凹目白鲑亲缘关系较近, 乌苏里白鲑与贝加尔凹目白鲑和高白鲑的分歧时间分别约为62.5万年和152万年, 在更新世。[中国水产科学, 2007, 14(1): 8-14]

关键词:乌苏里白鲑; 贝加尔凹目白鲑; 高白鲑; 细胞色素b; 16S rRNA

中图分类号: Q959.499

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)01-0008-07

乌苏里白鲑(*Coregonus ussuriensis*)、贝加尔凹目白鲑(*C. autumnalis migratorius*)和高白鲑(*C. peled*)隶属鲑形目(Salmoniforms)、鲑科(Salmonidae)、白鲑属(*Coregonus*), 为冷水性鱼类。乌苏里白鲑广泛分布于中国的黑龙江、乌苏里江、松花江、牡丹江、嫩江、兴凯湖和镜泊湖等水域, 是黑龙江水系特产经济鱼种。乌苏里白鲑肉质细嫩鲜美, 具有很高的营养价值, 是当地群众喜食鱼类之一^[1]。由于近年来的过度捕捞和环境变化, 乌苏里白鲑的捕捞群体结构发生了显著变化, 资源严重衰退, 已被列入《中国濒危动物(鱼类)红皮书》^[2]。贝加尔凹目白鲑分布于俄罗斯的贝加尔湖; 高白鲑是俄罗斯的特有鱼类, 分布于俄罗斯境内麦晋河至科雷马河一带的湖河中, 以鄂毕河流域为多。由于其重要的经济价值, 贝加尔凹目白鲑和高白鲑于1998年被引种到中国新疆赛里木湖, 在此新环境中生长状况良好^[3-4]。

关于上述3种白鲑的研究报道, 主要集中在移植增殖、生物学特性及生化遗传方面^[3-7], 国外学者报道了贝加尔凹目白鲑和高白鲑的部分线粒体DNA序列^[8-9], 但尚未见有关乌苏里白鲑该序列的

研究报道。线粒体DNA(mtDNA)是一种共价闭环双链DNA分子, 由于其具有遵循严格的母系遗传、几乎没有重组、结构简单、进化速度快、在不同的区域进化速度存在差异等优点, 逐渐成为种群遗传学和分子系统发育研究的重要标记^[10-12]。本研究利用相应引物对3种白鲑的Cyt b和16S rRNA基因片段进行了PCR扩增和序列测定, 探讨了3种白鲑的亲缘关系及分化年代, 并分析了不同基因片段核苷酸替代速率, 旨在为白鲑的资源保护及渔业管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

乌苏里白鲑样品于2004年10月采自乌苏里江; 贝加尔凹目白鲑和高白鲑样品于2004年4月采自新疆赛里木湖。取鳍条或肌肉样品于95%乙醇固定, 运到中国海洋大学渔业资源实验室后, -20℃以下保存备用。实验用白鲑样品每种各取3尾。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组总DNA提取

取3种白鲑组织各约

收稿日期: 2006-04-10; 修订日期: 2006-07-10.

基金项目: 科技部社会公益项目.

作者简介: 张俊丽(1972-), 女, 硕士在读, 研究方向为种群遗传. E-mail: zhangjunli640@sohu.com

通讯作者: 高天翔. Tel: 0532-82032063; E-mail: gaotianxiang@ouc.edu.cn

100 mg,使用基因组小量抽提试剂盒(上海生工)抽提基因组总DNA,用做模板DNA。

1.2.2 基因片段的PCR扩增、纯化 用于扩增Cyt b和16S rRNA基因片段的2对引物分别为,Cyt b:L14734-Glu(5'-AACACCGTTGTTATTC AACT-3')和H15149-Cyb(5'-CTCAGAATGA CATTGTCTCTCA-3');16S rRNA:L2510(5'-CGC CTGTTTAAACAAAACAT-3')和H3059(5'-CCG GTCTGAACTCAGATCATGTT-3')^[13]。在Biometra扩增仪上进行的PCR反应条件为:95℃预变性3 min;94℃变性45 s,52℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min。反应体积为50 μL,其中:10×PCR缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; 200 mmol/L KCl;100 mmol/L(NH₄)₂SO₄;15 mmol/L MgCl₂)5 μL,dNTP 200 μmol/L,引物各0.2 μmol/L,Taq酶1.25 U(大连宝生物公司),模板DNA20 ng,加Milli-Q H₂O至50 μL,并用石蜡油覆盖。

以上反应均设阴性对照以排除DNA污染的情况。取2 μL PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测(U=5 V/cm)。

1.2.3 目的片段的序列测定 用UNIQ-10柱式

DNA胶回收试剂盒(上海华舜)进行目的片段的回收纯化。用ABI公司3700型全自动DNA序列分析仪进行双向测序,测序反应采用与PCR反应一致的引物。

1.2.4 序列分析 用DNASTar软件(DNASTAR, Inc.)对所得序列进行编辑和排序比对。用MEGA 2.0软件^[14],基于Kimura-2^[14]模型,分析核苷酸组成及计算种间遗传距离,构建NJ树分析3种白鲢间亲缘关系;并利用MEGA 2.0软件^[14]将蛋白质编码基因核苷酸序列转化为氨基酸序列。

2 结果与分析

2.1 3种白鲢Cyt b基因序列分析

对3种白鲢的Cyt b基因片段进行测序、比对,得到402 bp的同源片段(图1)。获得的序列在GenBank上的登录号为DQ097735~DQ097738。乌苏里白鲢的3个个体中出现了2种单倍型(C.u1和C.u2),贝加尔凹目白鲢和高白鲢个体分别共享1种单倍型C.am1和C.p1。C.u1与C.u2之间有2个核苷酸替代(Nucleotide substitution),C.u1、C.u2与C.am1之间分别有4个和6个核苷酸替代,C.u1、C.u2与C.p1之间分别有11个和13个核苷

C.u1	ATG GCT AAT CTC CGA AAA ACC CAC CCC CTC CTA AAG ATT GCT AAT GAC GCA CTA GTC GAT CTT CCA GCG	[69]
C.u2	...	[69]
C.am1	...C...	[69]
C.p1	...C...	[69]
C.u1	CCC TCA AAC ATC TCA GTA TGA TGA AAC TTT GGC TCA CTT CTG GGC TTA TGT TTA GCC ACC CAA ATT CTC	[138]
C.u2	...	[138]
C.am1	...G...	[138]
C.p1	...G...	[138]
C.u1	ACA GGA CTT TTC CTG GCC ATG CAC TAC ACT TCT GAC ATC TCA ACA GCC TTC TCC TCC GTA TGC CAT ATT	[207]
C.u2	...	[207]
C.am1	...	[207]
C.p1	...G...	[207]
C.u1	TGC CGA GAT GTC AGC TAC GGC TGA CTT ATC CGA AAT ATT CAC GCC AAT GGA GCA TCT TTC TTC TTT ATC	[276]
C.u2	...	[276]
C.am1	...	[276]
C.p1	...C...	[276]
C.u1	TGC ATT TAT ATA CAC ATT GCC CGA GGA CTT TAC TAT GGC TCC TAC CTG TAC AAA GAA ACC TGA AAT ATT	[345]
C.u2	...	[345]
C.am1	...	[345]
C.p1	...T...	[345]
C.u1	GGA GTT GTC CTT CTG CTC CTT ACA ATA ATA ACT GCC TTC GTG GGC TAC GTT CTT CCA	[402]
C.u2	...	[402]
C.am1	...G...A...	[402]
C.p1	...G...A...A...	[402]

图1 3种白鲢Cyt b基因片段核苷酸序列比对

C.u1和C.u2:乌苏里白鲢;C.am1:贝加尔凹目白鲢;C.p1:高白鲢

Fig.1 Sequences alignment of partial Cyt b gene of three *Coregonus* species

C.u1 and C.u2: *C. ussuriensis*; C.am1: *C. autumnalis migratorius*; C.p1: *C. peled*

酸替代。替代位点分别在第9、69、87、111、133、198、234、255、309、348、354、360和387个碱基。13个核苷酸替代中包含12个转换(Transition)和1个颠换(Transversion),转换颠换比(T_s/T_v)为12。乌苏里白鲑和贝加尔凹目白鲑、高白鲑 *Cyt b* 基因的 A、T、G 和 C 含量见图2。结果表明,3种白鲑 *Cyt b* 基因

片段中 G 含量都比较低(平均含量为16%),在密码子第3位点上的平均含量仅为6.7%。在氨基酸水平上,3种间检测到1处氨基酸替代(Amino acid substitution),即第45位的 Ile 在 *C. u2* 突变为 Val,是由编码该氨基酸的密码子第一位上碱基由 A 替代为 G 引起的,其他核苷酸替代没有引起氨基酸替代(图3)。

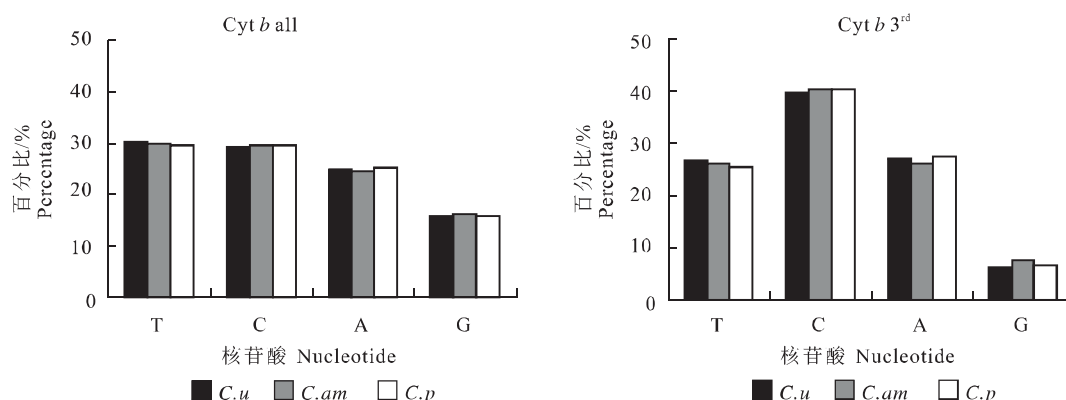


图2 3种白鲑 *Cyt b* 基因片段的核苷酸组成

注: *Cyt b all*, 整个片段; *Cyt b 3rd*, 蛋白质编码基因密码子第3位点; *C. u*, 乌苏里白鲑; *C. am*, 贝加尔凹目白鲑; *C. p*, 高白鲑

Fig. 2 Nucleotide compositions of partial cytochrome *b* gene of three *Coregonus* species

Note: *Cyt b all*—the partial cytochrome *b* gene, *Cyt b 3rd*—the third codon of the cytochrome *b* gene, *C. u*—*C. ussuriensis*, *C. am*—*C. autumnalis migratorius*, *C. p*—*C. peled*

C. u1	MANLRKTHPL LKIANDALVD LPAPSNISVW WNFGLSLGLC LATQILTGLF LAMHYTSDIS TAFSSVC	[67]
C. u2	V.....	[67]
C. am1		[67]
C. p1		[67]
C. u1	HICRDVSYGW LIRNIHANGA SFFFCICIYMH IARGLYGYSY LYKETWNIGV VLLLLTMMTA FVGYYVLP	[134]
C. u2		[134]
C. am1		[134]
C. p1		[134]

图3 3种白鲑氨基酸序列比对

C. u1 和 *C. u2*: 乌苏里白鲑; *C. am1*: 贝加尔凹目白鲑; *C. p1*: 高白鲑

Fig. 3 Amino acid sequences alignment of three *Coregonus* species

C. u1 and *C. u2*: *C. ussuriensis*; *C. am1*: *C. autumnalis migratorius*; *C. p1*: *C. peled*

从 GenBank 上检索、下载了白鲑属部分种的 *Cyt b* 基因序列6条(表1),经过序列比对,发现所测贝加尔凹目白鲑 *Cyt b* 基因片段序列与 GenBank 上 *C. autumnalis migratorius* 的该基因序列完全相同。选取其中396 bp的同源片段,以小柱白鲑(*Prosopium coulterii*)作为外群,利用 Kimura-2 模型构建 NJ 树,结果表明,乌苏里白鲑与贝加尔凹目

白鲑亲缘关系较近(图4)。乌苏里白鲑和贝加尔凹目白鲑、高白鲑间的平均遗传距离分别为0.012 5和0.030 5,两个形态学亚种贝加尔凹目白鲑和秋白鲑(*C. autumnalis autumnalis*)的遗传距离为0.023,种内距离大于贝加尔凹目白鲑与乌苏里白鲑种间的遗传距离(表2)。

表 1 种名、缩写、序列号及来源

Tab. 1 List of species names, abbreviations, accession numbers and sources used in this study

种名 Species name	缩写 Abbreviation	序列号 Accession number	来源 Source
贝加尔白鲑 <i>Coregonus autumnalis migratorius</i>	<i>C. am</i>	AJ251588	GenBank
<i>C. lavaretus baicalensis</i>	<i>C. lb</i>	AJ251589	GenBank
普轮白鲑 <i>C. autumnalis pollan</i>	<i>C. ap</i>	AJ251591	GenBank
<i>C. autumnalis</i>	<i>C. au</i>	AJ251592	GenBank
真白鲑 <i>C. lavaretus</i>	<i>C. l</i>	AJ617497	GenBank
秋白鲑 <i>C. autumnalis autumnalis</i>	<i>C. aa</i>	AJ617503	GenBank
乌苏里白鲑 <i>C. ussuriensis</i>	<i>C. u1, C. u2</i>	DQ097735-097736	This study
贝加尔凹目白鲑 <i>C. autumnalis migratorius</i>	<i>C. am1</i>	DQ097738	This study
高白鲑 <i>C. peled</i>	<i>C. p1</i>	DQ097737	This study
小柱白鲑 <i>Prosopium coulterii</i>	<i>P. c</i>	AY382563	GenBank

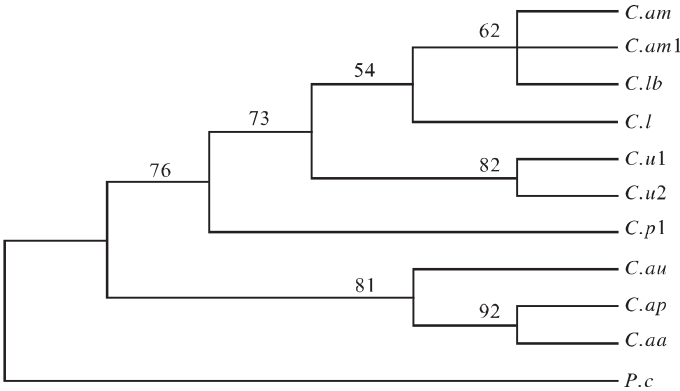


图 4 基于 Cyt b 基因片段序列构建的 NJ 树

注:节点上的数字为 1 000 次重复大于 50% 的自展置信值。

Fig. 4 Neighbor-joining tree based on sequence of partial Cyt b gene

Note: Numbers at nodes represent percentage of 1 000 bootstrap replications whose values are above 50%.

表 2 基于 Kimura-2 模型计算的白鲑各种间遗传距离

Tab. 2 Genetic distances caculated among Coregonus species based on Kimura-2 model

	<i>C. aa</i>	<i>C. am1</i>	<i>C. p1</i>	<i>C. u1</i>	<i>C. u2</i>
<i>C. aa</i>					
<i>C. am1</i>	0.023				
<i>C. p1</i>	0.028	0.018			
<i>C. u1</i>	0.034	0.010	0.028		
<i>C. u2</i>	0.039	0.015	0.033	0.005	

2.2 3 种白鲑分化时间的推算

脊椎动物的 Cyt b 基因序列可作为分子钟推测物种谱系间的分歧时间^[15-16]。根据 Cyt b 序列计算,乌苏里白鲑与贝加尔凹目白鲑、高白鲑间的分化时间约为 62.5 万年和 152 万年前,即在更新世。

2.3 3 种白鲑 16S rRNA 基因序列分析

对 3 种白鲑的 16S rRNA 基因片段进行测序、比对,得到 577 bp 的同源片段。获得的序列在

GenBank 上的登录号为 DQ399533~DQ399536。3 个乌苏里白鲑个体中出现了 2 种单倍型(图 5),2 种单倍型之间有 1 个碱基的差异。贝加尔凹目白鲑和高白鲑个体共享 1 种单倍型,2 种间没有碱基差异。3 种白鲑在该片段上有 3 个核苷酸替代位点,其中包括 2 个转换和 1 个颠换。A、T、G、C 含量见图 6,4 种核苷酸在 16S rRNA 片段上基本平均分布。

C.u1	CGC CTC TTG CAA ATC AAA GCA TAA GAG GTC CCG CCT GCC CTG TGA CTA TGG GTT TAA CGG CCG CGG TAT	[69]
C.u2		[69]
C.am		[69]
C.p		[69]
C.u1	TTT GAC CGT GCG AAG GTA GCG CAA TCA CTT GTC TTT TAA ATG AAG ACC TGT ATG AAT GGC ATC ACG AGG	[138]
C.u2		[138]
C.am		[138]
C.p		[138]
C.u1	GCT TAG CTG TCT CCT CTT CCA AGT CAG TGA AAT TGA TCT GCC CGT GCA GAA GCG GGC ATA AGT ACA TAA	[207]
C.u2		[207]
C.am		[207]
C.p		[207]
C.u1	GAC GAG AAG ACC CTA TGG AGC TTT AGA CAC CAG GCA GAT CAC GTC AAG CAA CCT TGA GTT AAC AAG TAA	[276]
C.u2		[276]
C.am		[276]
C.p		[276]
C.u1	AAA CGC AGT GAC CCC TAG CCC ATA TGT CTT TGG TTG GGG CGA CCG CGG GGG AAA ATA AAG CCC CCA TGT	[345]
C.u2		[345]
C.am		[345]
C.p		[345]
C.u1	GGA CTG GGG GCA CTG CCC CCA CAG CAG AGA GCT ACA GCT CTA AGC ACC AGA ATT TCT GAC CAA AAA TGA	[414]
C.u2		[414]
C.am		[414]
C.p		[414]
C.u1	TCC GGC GAA CGC CGA TCA ACG GAC CGA GTT ACC CTA GGG ATA ACA GCG CAA TCC TCT CCC AGA GTC CTT	[483]
C.u2		[483]
C.am		[483]
C.p		[483]
C.u1	ATC GAC GAG GGG GTT TAC GAC CTC GAT GTT GGA TCA GGA CAT CCT AAT GGT GCA GCC GCT ATT AAG GGT	[552]
C.u2		[552]
C.am		[552]
C.p		[552]
C.u1	TGG TTT GTT CAA CGA TTA AAG TCC T	[577]
C.u2		[577]
C.am		[577]
C.p		[577]

图 5 3 种白鲢的 16S rRNA 基因核苷酸序列比对

C. u1 和 C. u2; 乌苏里白鲢; C. am; 贝加尔凹目白鲢; C. p; 高白鲢

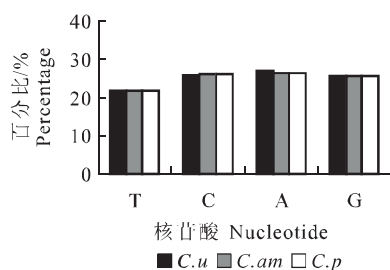
Fig. 5 Sequences alignment of 16S rRNA gene of three *Coregonus* speciesC. u1 and C. u2; *C. ussuriensis*; C. am; *C. autumnalis migratorius*; C. p; *C. peled*

图 6 3 种白鲢 16S rRNA 基因片段的核苷酸组成

C. u; 乌苏里白鲢; C. am; 贝加尔凹目白鲢; C. p; 高白鲢

Fig. 6 Nucleotide compositions of 16S rRNA gene of three *Coregonus* speciesC. u; *C. ussuriensis*; C. am; *C. autumnalis migratorius*; C. p; *C. peled*

3 讨论

4 种核苷酸在线粒体基因组中分布不均一是动物线粒体基因组的共性^[12,17]。3 种白鲢的 *Cyt b* 基因片段核苷酸组成分析的结果显示:G 的含量低于其他 3 种碱基,密码子第 3 位碱基的组成存在较大的偏倚(Bias),G 的含量最低,平均仅为 6.7%。与之相比较,3 种白鲢的 16S rRNA 基因片段核苷酸组成较均一。Meyer^[18]认为,密码子第 3 位碱基的突变受自然选择压力小,突变率高,但这种突变很少导致氨基酸替代,并且比导致氨基酸替代的突变积累得快。最常见的突变是密码子第 3 位碱基的转换,其次是密码子第 3 位碱基的颠换和密码子第 1

位碱基的无义转换。由于蛋白质编码基因在密码子第3位碱基上受到的功能限制较小,所以密码子第3位碱基能够更清晰地表明线粒体基因组核苷酸组成的不均一性。3种白鲑Cyt b基因片段的结果与此一致,在其他鱼类如星鲮(圆斑星鲮 *Verasper variegatus* 和条斑星鲮 *V. moseri*)、斑马鱼(*Danio rerio*)等也获得了类似的结果^[19-20]。在密码子第3位碱基上有11个转换和1个颠换,仅乌苏里白鲑有1个个体在密码子第1位碱基上发生了1个核苷酸替代导致氨基酸替代,由第45位点的Ile突变为Val,是由密码子第1位碱基上的A替代为G,属于非同义替换。除这1个氨基酸替代外(图3),其余都是同义替换。

有研究表明,线粒体不同基因的进化速率存在差异^[18,21]。从本研究结果可以看出,3种白鲑Cyt b基因序列间有13个碱基差异,而对于16S rRNA基因片段,贝加尔凹目白鲑和高白鲑的所有个体共享1种单倍型,3种白鲑间只有3个碱基差异,Cyt b基因进化速率大于16S rRNA基因。由于Cyt b基因进化速率快,作为在鱼种类内和种间水平的分子系统发育研究中一个很好的基因标记,已得到了广泛应用,如在江鲢(*Lota lota*)^[22]、宽鳍鱥(*Zacco platypus*)^[23]、鳊属鱼类^[24]和其他一些鱼类均有报道^[25]。16S rRNA基因序列非常保守,不适合白鲑属内的系统研究,而适用于亲缘关系较远的阶元间的系统进化分析^[18,22]。

Hewitt^[26]提出,物种形成过程主要发生在新世和更新世。目前很多研究者将2%/100万年的核苷酸分歧速率应用在Cyt b基因片段上来推算硬骨鱼的分化年代^[15-16]。应用这一标准,乌苏里白鲑和贝加尔凹目白鲑、高白鲑的分化年代分别为62.5万年和152万年前,大约在更新世。

另外,乌苏里白鲑与贝加尔凹目白鲑的遗传距离为0.0125,而*C. autumnalis*的两个形态学亚种贝加尔凹目白鲑和秋白鲑的遗传距离为0.023,种内距离大于贝加尔凹目白鲑与乌苏里白鲑种间的遗传距离。传统的形态学和分子水平分类结果存在一定的分歧,需要进一步深入研究。

贝加尔凹目白鲑和高白鲑的序列差异分析结果表明,2种的遗传多样性不高。通过鱼类移植增殖形成的群体,大量个体来自于极少的亲本,是造成群体基因遗传多样性低的重要原因。因此,对引进鱼种资源的形成和稳定情况需要进行长期的监测,以

探讨其在新环境中遗传多样性的变化。捕捞压力是另一个可以降低遗传多样性的主要原因。乌苏里白鲑经过多年的过度捕捞,目前资源量锐减,应在考虑种质资源保护的情况下开展人工增殖。

致谢:刘进贤博士在数据分析方面给予了帮助和指导,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 董崇智,李怀明,牟振波,等.中国淡水冷水性鱼类[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2002:56—58.
- [2] 梁利群,常玉梅,董崇智.黑龙江乌苏里白鲑遗传多样性分析[J].中国水产科学,2004,11(6):501—505.
- [3] 张北平,杨文荣,张人铭,等.赛里木湖移植的高白鲑(*Coregonus peled*)生长发育[J].水产学杂志,2000,13(2):36—41.
- [4] 张人铭,郭焱,蔡林钢,等.赛里木湖凹目白鲑的生物学研究[J].水产学杂志,2003,16(1):39—43.
- [5] 董崇智,姜作发.黑龙江绥芬河兴凯湖渔业资源[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2004:69—70.
- [6] 田希文,陈春山,于信勇,等.利用胰蛋白酶分离乌苏里白鲑鱼卵的技术研究[J].淡水渔业,1994,24(3):11—13.
- [7] 马波,石连玉,董崇智.乌苏里白鲑的生化遗传结构[J].中国水产科学,2003,10(3):195—199.
- [8] Sukhanova L V, Smirnov V V, Smirnova—Zalumi N S, et al. Grouping of Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* Georgi within the *C. lavaretus* complex confirmed by using a nuclear DNA marker[J]. Annales Zoologici Fennici, 2004, 41: 41—49.
- [9] Politov D V, Bickham J W, Patton J C. Molecular phylogeography of Palearctic and Nearctic ciscoes[J]. Annales Zoologici Fennici, 2004, 41: 13—23.
- [10] 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.
- [11] Avise J C. Phylogeography[M]. London: Harvard University Press, 2000: 1—36.
- [12] Brown W M. Evolution of Genes and Proteins[M]. Sunderland: Sinauer, 1983: 62—88.
- [13] Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, et al. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences[J]. Mol Phylogen Evol, 2001, 20(2): 275—285.
- [14] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis Software[J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1244—1245.
- [15] Bermingham E, McCafferty S S, Martin A P. Molecular Systematics of Fishes[M]. San Diego: Academic Press, 1997: 113—128.
- [16] Bowen B W, Bass A L, Rocha L A, et al. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a

- global scale[J]. *Evolution*, 2001, 55(5): 1 029—1 039.
- [17] Brown W M. The mitochondrial genome of animals[M]//Molecular Evolutionary Genetics. New York: Plenum Press, 1985: 95—130.
- [18] Meyer A. Evolution of mitochondria DNA in fishes[J]. *Biochem Mol Biol Fishes*, 1993, 2: 1—36.
- [19] Esposti D M, De V S, Crimi M, et al. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1993, 1 143(3): 243—271.
- [20] 项方, 邹记兴, 邓凤姣, 等. 用细胞色素 *b* 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育[J]. *动物学杂志*, 2004, 39(5): 13—18.
- [21] 高天翔, 陈四清, 刘进贤, 等. 圆斑星鲮与条斑星鲮线粒 DNA 部分片段的序列比较研究[J]. *高技术通讯*, 2004, 14: 329—334.
- [22] Van Houdt J K, Hellemans B, Volckaert F A M. Phylogenetic relationships among Palearctic and Nearctic burbot (*Lota lota*) : Pleistocene extinctions and recolonization[J]. *Mol Phylogen Evol*, 2003, 29: 599—612.
- [23] Perdices A, Cunha C, Coelho M M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome *b* sequences[J]. *Mol Phylogen Evol*, 2004, 31(1): 192—203.
- [24] Aoyama J, Kobayashi T, Tsukamoto K. Phylogeny of eels suggested by mitochondrial DNA sequences[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1996, 62: 370—375.
- [25] Minamoto T, Shimizu I. Phylogenetic relationship among Osmerid and Salangid fish inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences[J]. *Mem Fac Sci Kyoto Univ*, 2002, 18: 1—13.
- [26] Hewitt G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation[J]. *Biol J Linnean Soc*, 1996, 58(3): 247—276.

Sequence analysis of partial cytochrome *b* and 16S rRNA genes of three *Coregonus* species

ZHANG Jun-li¹, GAO Tian-xiang¹, HAN Zhi-qiang¹, GUO Yan², DONG Chong-zhi³

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Xinjiang Weiur Autonomous Region Fishery Institute, Wulumuqi 830000, China; 3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: To evaluate the genetic variance of three *Coregonus* fish of *Coregonus ussuriensis*, *C. autumnalis migratorius* and *C. peled*, partial sequence of cytochrome *b* and 16S rRNA genes from three individuals of each *Coregonus* species were amplified and sequenced. The sequence data of partial cytochrome *b* gene (402 bp) showed that there were two haplotypes (*C. u1* and *C. u2*) in the three individuals of *C. ussuriensis*. There was only one haplotype found in *C. autumnalis migratorius* (*C. am*) and *C. peled* (*C. p1*), respectively. Of the 577 nucleotides of partial 16S rRNA gene, no interspecific sequence variations were observed between *C. autumnalis migratorius* and *C. peled* and two haplotypes were observed in the three *C. ussuriensis* individuals. This suggests that the evolution rate of cytochrome *b* was faster than that of 16S rRNA in *Coregonus*. Based on sequences of partial cytochrome *b* gene, a phylogenetic tree was constructed by NJ method. The phylogenetic tree showed that *C. ussuriensis* and *C. autumnalis migratorius* was closely related. The estimated divergence time between *C. ussuriensis* and *C. autumnalis migratorius* was about 0.625 million years ago, while it was about 1.52 million years ago between *C. ussuriensis* and *C. peled*. The divergence of the three *Coregonus* species might had occurred in Pleistocene. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 8—14]

Key words: *Coregonus ussuriensis*; *C. autumnalis migratorius*; *C. peled*; cytochrome *b*; 16S rRNA

Corresponding author: GAO Tian-xiang. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn