

13种鲟形目鱼类线粒体DNA的PCR-RFLP分析

汪登强^{1,2}, 危起伟^{1,2}, 王朝明^{2,3}, 罗晓松¹

(1. 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 湖北 荆州 434000; 2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所 湖北 荆州 434000; 3. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:以白鲟科和鲟科的13种鲟鱼为研究对象,设计7对特异引物,利用PCR技术扩增鲟形目(Acipenseriformes)鱼类线粒体DNA(mtDNA),扩增片段大小在2~3 kb,总长度约为整个mtDNA的97%。同时利用3个限制性内切酶,即Mbo I、Cfo I和Hae III对13种鲟形目鱼类进行限制性酶切片长度多态性(RFLP)分析。结果总共检出233条电泳带,其中209条有多态现象,表明鲟形目鱼类mtDNA存在广泛变异。但是各个扩增片段的变异程度并不相同,其中NADH脱氢酶亚基基因的RFLP多态性较丰富,其次是细胞色素c氧化酶亚基基因,而两个rRNA基因最贫乏。说明在鲟形目鱼类mtDNA的进化中NADH脱氢酶亚基基因速率最快,细胞色素c氧化酶亚基基因次之,rRNA基因最慢。分子系统分析结果显示,鲟科的6种鱼与匙吻鲟和白鲟分成两大支;鲟科中两种鲟鱼没有聚到一起,支持了鲟鱼不能作独立分类单元的观点。本研究旨在为鲟形目鱼类遗传和进化研究提供科学依据。

关键词:鲟形目;线粒体DNA;PCR-RFLP

中图分类号:Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0383-07

鲟形目(Acipenseriformes)鱼类是一类古老的软骨硬鳞鱼类,有“活化石”之称,在研究鱼类乃至整个脊椎动物的系统进化中占有极其重要的地位。全世界现存鲟鱼约有27种,均分布于北半球,是淡水生态系统中个体最大的鱼类^[1]。这些鲟鱼均处于程度不等的濒危状态,有的几近灭绝^[2]。由于鲟形目鱼类极具学术价值和经济价值,人们很早就开始对鲟形目鱼类进行研究。有关鲟形目鱼类的分子遗传学研究始于20世纪90年代初,已积累相当多的文献,但以分析群体遗传结构居多^[3~6]。分子系统演化方面仅有少量报道,且限于随机扩增多态性DNA(RAPD)以及mtDNA-RFLP和较短序列研究^[10~14]。这是由于取材困难,且适合于鲟鱼类的PCR引物不多^[11]。现有的研究结果对鲟形目特别是鲟科内部的系统分类仍没有取得一致的意见。因此,仍需要积累更多的数据,以及更长的序列。

动物线粒体DNA(mtDNA)由于具有母系遗传特性,分子量小及进化适中等特点,在分子系统发育学方面仍然是首选的研究对象。最近几年里一些学者选择对鲟鱼mtDNA的不同区域序列进行了分

析,大都集中在mtDNA控制区,也有少量在其他区域。目前已得到了3种鲟鱼mtDNA全序列^[1]。为了更全面地了解所有鲟鱼的mtDNA,本研究设计了7对新的鲟形目特异引物,用PCR技术将鲟鱼整个mtDNA扩增出来,旨在为鲟形目鱼类的遗传和进化研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样品包括匙吻白鲟科(Polyodontidae)和鲟科(Acipenseridae)的鲟鱼共13种,即白鲟(*Pseudoscaphorhynchus gladius*,取自重庆)、匙吻鲟(*Polyodon spathula*,取自美国)、欧洲鳇(*Huso huso*,取自俄罗斯)、达乌尔鳇(*Huso dauricus*,取自黑龙江)、中华鲟(*Acipenser sinensis*,取自宜昌)、施氏鲟(*A. schrenckii*,取自黑龙江)、达氏鲟(*A. dabryanus*,取自重庆)、西伯利亚鲟(*A. baerii*,取自俄罗斯)、库页岛鲟(*A. medius*,取自俄罗斯)、短吻鲟(*A. brevirostris*,取自美国)、俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedti*,取自俄罗斯)、意大利鲟(*A. naccarii*,取自意大利)和闪光鲟(*A. stellatus*,取自俄罗

收稿日期:2004-05-14; 修订日期:2004-12-03.

基金项目:国家基础工作重点项目(2002-2003);中国水产科学研究院青年基金。

作者简介:汪登强(1973-),助理研究员,主要从事鱼类遗传学研究。Tel:0716-8212277-3005. E-mail:wedq@yfi.sc.cn

通讯作者:危起伟。Tel:0716-8212277-3001. E-mail:weiqw@yfi.sc.cn

斯),其中匙吻鲟、中华鲟、施氏鲟、意大利鲟各2尾,其余种类各1尾,均为酒精保存的鳍条或肌肉。

1.2 总DNA的提取

用STE缓冲液将组织泡洗5h以上,以去酒精。取约0.2g组织,剪碎,放入1.5mL离心管,每管加0.5mL STE、蛋白酶K 15 μ L (10 mg/mL)和SDS 40 μ L (10%)于50℃水浴4~6h。按标准酚氯仿的方法去除蛋白^[13]。

1.3 引物及PCR筛选

用7对引物扩增mtDNA不同的区域,扩增的部位见图1。引物的序列如下:

L1: 5'-ACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAG-TAATC-3'和H1: 5'-ATCATGACAAAG-GCGTGGGCTGTAACGA-3'; L2: 5'-GTATTG-GTGCTGAGCAGGCATAAGC-3'和H2: 5'-CAGGTGTGTGGGCTCATGAATTGGT-3'; L3: 5'-TAACCTGAACCTGACCATGATCCTAAGC-3'和H3: 5'-ATGAAGGCGGAGCTGAAGCTG-AAGTGTAC-3'; L4: 5'-TCGCAACGAAC-CTACATTACCTTCTAG-3'和H4: 5'-GAG-

GCTGTGGATAATGGATCCGGATCA-3'; L5: 5'-GTAGCATTCTCTACATCCAGCCAACTAGG-3'和H5: 5'-AAGAGTGCAATGGGGTGATG-CCGATAG-3'; L6: 5'-AGCCCGAGGCATAT-ACTATGGCTCATACC-3'和H6: 5'-CTTCAT-ACGCTACACCTCGACCTGACGT-3'; L7: 5'-CA-GACCCACCTAGAGGAGCTGTTCT-3'和H7: 5'-TTAGGATGTCTGATCCAACATCGAGGTC-3'。

PCR用TaKaRa公司(大连)的LA Taq DNA聚合酶,反应体系为:LA Taq DNA聚合酶2个单位;10 $\times$ LA Buffer (Mg^{2+} free) 5 μ L; $MgCl_2$ (25 mmol/L) 5 μ L; 10 mmol/L dNTP 1 μ L; 10 μ mol/L引物对各2 μ L; 模板DNA 100~1 000 μ g; 加无菌去离子水至50 μ L。PCR反应共设30个循环,每一循环包括95℃ 30 s, 60℃ 50 s, 72℃ 3 min。开始循环前在96℃预先变性1 min,循环结束后72℃再延伸15 min。为了增强PCR扩增的特异性,反应液在冰上配制,等PCR仪温度升到80℃后,再将离心管放入PCR仪进行反应。

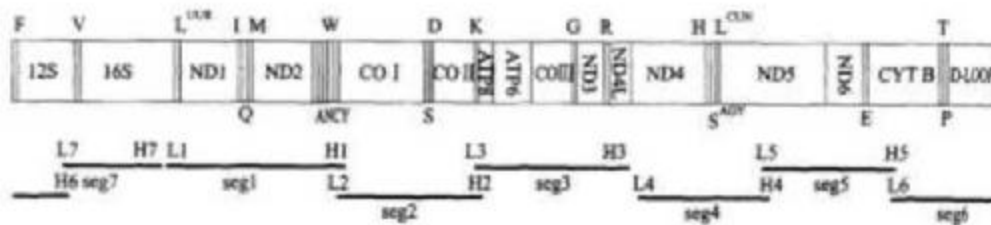


图1 mtDNA结构示意图及引物的位置

Fig. 1 Gene organization of Acipenseriformes mtDNA and locations of primers in mtDNA

1.4 限制性内切酶酶切及电泳

PCR结束后,取2 μ L反应液用0.8%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)的电泳,紫外灯下观察扩增的效果。根据扩增产物的量,取适量的反应液用Mbo I (GATC)、Cfo I (GCGC)和Hae III (GGCC)3种内切酶进行酶切,反应条件根据内切酶说明书进行。酶切反应在4~6h后,移至68℃水浴30 min终止反应。酶切产物在2.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)、80 V电压下电泳,紫外灯下观察照相。

1.5 数据处理

将酶切结果依据相对位置有无DNA电泳带转换成1-0后,PHYLP软件包计算Nei等遗传距离^[16],再根据遗传距离数据构建UPGMA分子系统树。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增

为了便于分析,我们将7对引物扩增的片段标为seg1至seg7(表1)。7对引物对鲟形目鱼类的扩增特异性非常高,扩增的片段长度分别为约3 kb (seg1)、2.6 kb (seg2)、2 kb (seg3)、2.4 kb (seg4)、2.2 kb (seg5)、2.5 kb (seg6)、2 kb (seg7),总长度约占整个mtDNA的97%。

2.2 RFLP分析

3个内切酶对13种鲟鱼的PCR产物的RFLP总共检测到233条DNA电泳带,其中有209条产生多态。匙吻鲟、中华鲟、施氏鲟、意大利鲟种内个体间

未见差异。*Hae* III对 *seg4* 的酶切得到的片段最多,达19条,而 *Cfo* I在 *seg2* 上没有切点。各个内切酶对7个扩增的片段的RFLP结果列于表1至表3。各个扩增片段得到的DNA电泳带数分别为:42(*seg1*)、24(*seg2*)、27(*seg3*)、47(*seg4*)、36(*seg5*)、33

(*seg6*)、24(*seg7*)。除 *Cfo* I两个片段(*seg2*, *seg7*)的酶切无差别外,其余均存在差异。而 *seg6* 在8种鲷鱼中的差异最为复杂,该片段包括mtDNA的控制区。说明鲷形目鱼类mtDNA存在广泛变异。

表1 *Hae* III对8种鲷鱼mtDNA RFLP的特征Tab.1 Character of RFLP result by *Hae* III

物种	片段 Segment						
Species	seg1	seg2	seg3	seg4	seg5	seg6	seg7
PT	0001110101001001	1100101111	100000010010	0000010110110001000	0000110010010	0100010010	101111
PG	0001010101010011	1010111111	010001100010	0010000111000001000	0000001110011	0101100010	101111
AB	1001110000111111	0011001111	001001101010	1000000000001001000	0001000110101	1000010010	101111
DH	0010011000011111	0011001111	010000100111	0000100110010111010	0100000100101	0100001010	111001
HH	0000011100001001	0010101111	100001101010	0000011000001011000	1000000011000	0100001010	111001
AS	0010001100001111	1001100111	110000010111	0000010011001011101	0100000000101	1000100101	1111001
AD	0000010001101111	1100001111	000101101010	0110000000000001101	0010001100010	0000101110	111001
AS	0000010001101111	1100001111	000011101010	0011000001000001101	0010001100010	0010001011	111001
AM	0100010010101111	0010001111	100001101010	0011000100000011001	0001000001011	1000010010	111001
AR	0010011000001111	0010101111	100000100111	0000111000001001001	1000000011000	0100001010	111001
AG	0010011000101111	0011001111	100001101010	0001100010001011001	0100000100011	0100001110	111001
AN	0000111000001111	0010101111	000100101010	0001011000010011001	1000000110010	0010001010	111001
AT	0000111000111111	0011001111	001001101010	0011000001001001000	1000000100101	1000010011	111001

注:0,1表示各种鱼在相同位置有或无DNA带。AB:西伯利亚鲷;AD:达氏鲷;AG:俄罗斯鲷;AM:库页岛鲷;AN:意大利鲷;AR:短吻鲷;AS:中华鲷;ASC:施氏鲷;AT:闪光鲷;DH:达乌尔鲷;HH:欧洲鲷;PG:白鲷;PT:匙吻鲷。

Note:0,1 indicate absence or presence of the DNA bands. AB: *A. baerii*; AD: *A. dabryanus*; AG: *A. guelden*; AM: *A. medius*; AN: *A. n. accuri*; AR: *A. berioi*; AS: *A. sinensis*; ASC: *A. xerobii*; AT: *A. stellatus*; DH: *H. dauricus*; HH: *H. huso*; PG: *Pagrus gladius*; PT: *Polyodon spathula*.

表2 *Cfo* I对8种鲷鱼mtDNA RFLP的特征Tab.2 Character of RFLP result by *Cfo* I

物种	片段 Segment						
Species	seg1	seg2	seg3	seg4	seg5	seg6	seg7
PT	010001010	1	01100	000010100110	10000001	00001011101	11111
PG	010001010	1	01100	000011000110	10000001	00001111110	11111
AB	000110100	1	00111	000100011000	10000001	10000001100	11111
DH	001000001	1	10010	100000000000	00011000	01000001101	11111
HH	100000000	1	10010	001000011000	00100100	00001101101	11111
ASC	100000000	1	10010	010000001001	00100100	00100011101	11111
AD	001000001	1	00111	010000001001	01000010	00100011101	11111
AS	001000001	1	00111	010000001001	01000010	00010011101	11111
AM	100000000	1	10010	001000001001	01000010	01010001101	11111
AR	100000001	1	10010	001000011000	00100010	00100011101	11111
AG	001000100	1	10010	100000001000	00010010	01000001101	11111
AN	100000000	1	10010	000100011001	00011000	00100001101	11111
AT	001100100	1	00111	010000011000	01000010	00010011101	11111

注:0,1表示各种鱼在相同位置有或无DNA带。AB:西伯利亚鲷;AD:达氏鲷;AG:俄罗斯鲷;AM:库页岛鲷;AN:意大利鲷;AR:短吻鲷;AS:中华鲷;ASC:施氏鲷;AT:闪光鲷;DH:达乌尔鲷;HH:欧洲鲷;PG:白鲷;PT:匙吻鲷。

Note:0,1 indicate absence or presence of the DNA bands. AB: *A. baerii*; AD: *A. dabryanus*; AG: *A. guelden*; AM: *A. medius*; AN: *A. n. accuri*; AR: *A. berioi*; AS: *A. sinensis*; ASC: *A. xerobii*; AT: *A. stellatus*; DH: *H. dauricus*; HH: *H. huso*; PG: *Pagrus gladius*; PT: *Polyodon spathula*.

表3 Mbo I对8种鲟鱼mtDNA RFLP的特征

Tab.3 Character of RFLP result by Mbo I

物种	片段 Segment						
Species	seg1	seg2	seg3	seg4	seg5	seg6	seg7
PT	0011001111010000	010010101001	1000011000	11000100000011010	000011110001101	010000000101	011010110011
PG	00110010110101001	010000111001	1010011000	01010000000011110	010100110001001	001010001000	001110110111
AB	00110011010100001	100000101011	1000011000	01000001000011000	001100000010011	10000000011	011010110110
DH	10100000000000101	000110101101	0100011010	00100001010011001	011000000010011	000100110011	011001110110
HH	1000100100000000	001001101001	1000011000	0100000100111100	100000001010011	100000000011	011010110110
ASC	00010100110100111	000001111011	1000011000	01010001000000100	100000001010011	001000000011	1100010110110
AD	00010100100100111	001001101011	0001101101	01000001001011000	100000000110011	000110000011	1100010110110
AS	0110000001011000	001001101011	0001101101	01000011000011001	100000000110011	000101000011	1100010110110
AM	00110000001000101	000001111011	1000011000	01000001000011001	100000000110011	000100100011	1100010110110
AR	10011000000100111	001001101101	0100011100	01011000000011000	011000000110011	100000000011	0110100110110
AG	00101000000000001	000111001001	0100001100	00100001000011100	010000001010011	000100100011	0110100110110
AN	00011000001011000	001001101011	1000001010	01001000010010001	001100000010011	001000110011	1100010110110
AT	00110010000100101	100000101011	0100011100	01010000100011001	010100001010011	000101010011	011010110110

注:0,1表示各种鱼在相同位置有或无DNA带。AB:西伯利亚鲟;AD:达氏鲟;AG:俄罗斯鲟;AM:库页岛鲟;AN:意大利鲟;AR:短吻鲟;AS:中华鲟;ASC:施氏鲟;AT:闪光鲟;DH:达乌尔鲟;HH:欧洲鲟;PG:白鲟;PT:匙吻鲟。

Note:0,1 indicate absence or presence of the DNA bands. AB: *A. baerii*; AD: *A. dabryanus*; AG: *A. guldensis*; AM: *A. medius*; AN: *A. naccarii*; AR: *A. breviro*; AS: *A. sinensis*; ASC: *A. schrenkii*; AT: *A. stellatus*; DH: *H. dauricus*; HH: *H. huso*; PG: *Purphurus gladius*; PT: *Poliodon spatula*.

根据上述3个表的数据,计算出个体间的遗传距离列于表4。8种鲟鱼中遗传距离最小的是中华鲟和达氏鲟,为0.0058,最大的是白鲟和意大利鲟,为0.0485。基于遗传距离构建UPGMA分子系统树(图2),13种鲟鱼分成两大支,一支为白鲟和匙吻

鲟,其他鲟鱼组成另一支。后者又分为两小支,其中中华鲟和达氏鲟组成一小支,其余4种鲟鱼组成另一小支。但两种鲟鱼(达乌尔鲟和欧洲鲟)并不聚在一起。

表4 基于mtDNA PCR-RFLP得到的8种鲟形目鱼类的遗传距离

Tab.4 Genetic distance of eight species of Acipenseriformes base on mtDNA PCR-RFLP

	PS	PG	AB	HD	HH	ASC	AD	AS	AM	AR	AG	AN
PG	0.018 1											
AB	0.032 1	0.030 8										
HD	0.046 4	0.044 1	0.031 2									
HH	0.036 3	0.040 9	0.027 8	0.031 6								
ASC	0.043 9	0.039 3	0.031 5	0.024 5	0.023 3							
AD	0.045 6	0.042 1	0.031 8	0.034 4	0.034 7	0.023 3						
AS	0.045 5	0.046 1	0.034 1	0.034 4	0.034 7	0.030 3	0.005 8					
AM	0.045 1	0.044 2	0.025 6	0.025 9	0.024 6	0.017 7	0.019 8	0.018 1				
AR	0.041 6	0.043 5	0.029 4	0.022 6	0.014 0	0.021 1	0.025 2	0.031 5	0.024 2			
AG	0.047 7	0.045 3	0.028 4	0.014 6	0.023 3	0.025 9	0.026 2	0.026 2	0.020 3	0.021 0		
AN	0.046 5	0.048 5	0.029 9	0.025 9	0.021 6	0.022 3	0.026 6	0.023 6	0.020 7	0.021 3	0.026 3	
AT	0.042 8	0.036 2	0.014 5	0.025 1	0.028 0	0.026 4	0.023 9	0.021 3	0.021 1	0.023 6	0.020 8	0.028 9

注:AB:西伯利亚鲟;AD:达氏鲟;AG:俄罗斯鲟;AM:库页岛鲟;AN:意大利鲟;AR:短吻鲟;AS:中华鲟;ASC:施氏鲟;AT:闪光鲟;DH:达乌尔鲟;HH:欧洲鲟;PG:白鲟;PT:匙吻鲟。

Note:AB: *A. baerii*; AD: *A. dabryanus*; AG: *A. guldensis*; AM: *A. medius*; AN: *A. naccarii*; AR: *A. breviro*; AS: *A. sinensis*; ASC: *A. schrenkii*; AT: *A. stellatus*; DH: *H. dauricus*; HH: *H. huso*; PG: *Purphurus gladius*; PT: *Poliodon spatula*.

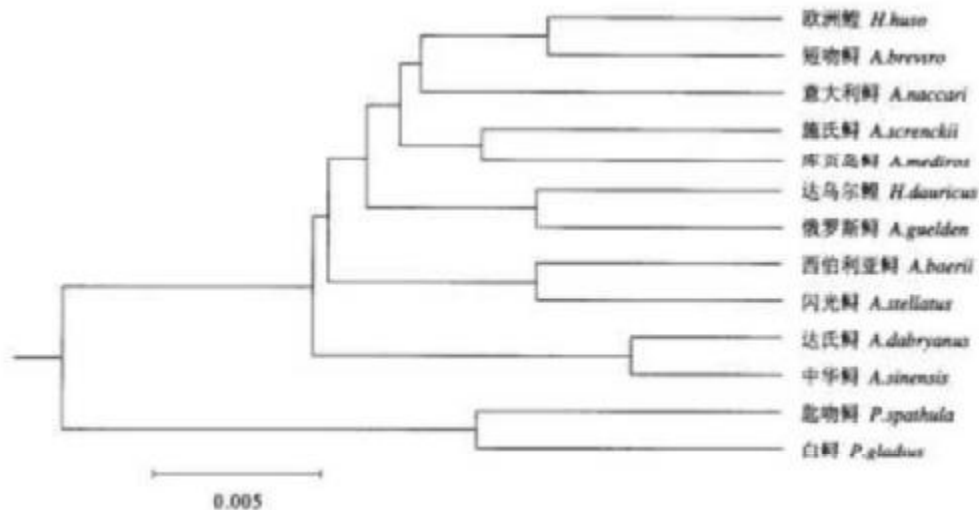


图2 8种鲟形目鱼类的UPGMA分子系统图

Fig.2 The UPGMA tree of eight species of Acipenseriformes

3 讨论

动物 mtDNA 常被用于物种分子进化、种系划分、遗传多样性等研究。但是 mtDNA 不同的基因或区域,进化速度不同,因而能提供的信息量也不同。不同科研工作者根据不同的区域研究相同对象,得出结果往往存在一些差异。例如, Birstein 等^[13]测定的 mtDNA12S 和 16S rRNA 及细胞色素 b 基因序列,得到的变异信息比张四明等^[14]研究的 ND4L-ND4 基因序列要少的多。从本研究初步的结果看,除了包含 D-LOOP 区的 seg6 外, seg1 和 seg4 获的 DNA 电泳带要较多,其他 3 个片段带数较少(表 1 至表 3)。反映了鲟形目 mtDNA 的几个 NADH 脱氢酶亚基基因(ND1、ND2、ND4、ND5、ND6)碱基变异较大,进化速率比较快;3 细胞色素 c 氧化酶亚基基因(CO I、CO II、CO III)碱基变异较少,进化速率比较慢;两个 rRNA(12S rRNA 和 16S rRNA)基因(seg7)的 24 条 DNA 电泳带中,仅 14 条的在 8 种鱼中表现出差异,变化最少。说明 rRNA 基因在鲟形目中 mtDNA 进化上最为保守,与脊椎动物 mtDNA 的一般进化方式类似^[13,17]。

尽管鲟形目鱼类有极高的学术和经济价值,对它们的研究也开展得比较早,但是人们对它们系统发育和种间关系了解的较少。由于鲟形目鱼类形态变化和生长速度差异大,种间甚至属间能够杂交,产生可育后代。所以近年来积累的分子分类与形态分

类存在许多争议,就是不同分子数据之间也存在争议。这些争议主要来自鲟科内部的种间关系^[10-14]。使用分子生物学技术来研究鲟鱼系统发育始于 1996 年, Brown 等^[10]利用 mtDNA 限制性片段长度多态性(RELP)分析北美地区 4 种鲟鱼。根据 RFLP 数据,他们发现位于太平洋地区的高首鲟和中吻鲟之间比位于其他地区的翘鲟和尖吻鲟更为接近,并用地理位置关系解析这一结果。但这种解析并不得到 Birstein 等用细胞色素 b 基因序列研究结果的支持^[11]。后者使用 mtDNA 12S、16S rRNA 及细胞色素 b 基因部分序列分析了所有现存鲟科鱼,认为现存鲟科鱼至少存在 3 个分支,并与它们的倍性和分布地理有一定的关系,但位于长江的中华鲟和达氏鲟并不在一个分支上^[11]。随后张四明等分析了 mtDNA ND4L-ND4 基因序列,认为 mtDNA ND4L-ND4 基因序列在鲟形目中变异较大,适合用于鲟鱼分子系统研究。由此得出中华鲟和达氏鲟遗传距离最近,并提出达氏鲟是中华鲟的陆封种类的观点。他们还认为环太平洋地区的鲟科鱼类有共同的起源。尽管这些分子数据存在着争议,但都不支持两种鳇鱼,即欧洲鳇和达乌尔鳇作为独立的鳇属存在。本研究通过对几乎整个 mtDNA RFLP 分析,所得的系统树首先分成两大支,匙吻鲟科的白鲟和匙吻鲟为一支,另外 6 种鲟鱼为一支,与所有的形态学分类和分子分类的结果一致。其次 6 种鲟科鱼中,中华鲟和达氏鲟首先与其他鲟鱼分开,且它们遗

传距离最小,这支持以 ND4L-ND4 基因序列分析的结果^[14],而以 12S、16S rRNA 及细胞色素 b 基因部分序列的分析结果不符^[11]。再者,两种鲟鱼未聚在一起,支持所有分子数据结论,即这两种鲟鱼不能作为一个独立的鲟属分类单元。但是,分属于两个属的白鲟和匙吻鲟的遗传距离比鲟属内的种间的遗传距离要小(表 4 和图 2),这可能与本实验所用的内切酶有关。由于脊椎动物 mtDNA 的碱基组成中 A + T 含量大于 G + C 含量^[15,17],而本研究所用的内切酶识别序列以 G 和 C 为主。因此,要想获得更理想的结果,须使用更多的内切酶,乃至对 mtDNA 进行全序列测序。

参考文献:

- [1] Bemis W E, Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history [J]. Environ Biol Fish, 1997, 48: 167 - 183.
- [2] Birstein V J, Bemis W E, Waldman J R. The threatened status of Acipenseriform species: a summary [J]. Environ Biol Fish, 1997, 48: 427 - 435.
- [3] Doukakis P, Birstein V J, Rubin G I, et al. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus* [J]. Mol Ecol, 1998, 8: S117 - S127.
- [4] Pourkazemi M, Skibinski D O F, Beardmore J A. Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea [J]. J Appl Ichthyol, 1999, 15: 23 - 28.
- [5] King T L, Lubinski B A, Spidle A P. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae [J]. Cons Genet, 2001, 2: 103 - 119.
- [6] Grunwald C, Stabile J, Waldman J R, et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. Mol Ecol, 2002, 11(10): 1885 - 1898.
- [7] Quattro J M, Greig T W, Coughlan D K, et al. Genetic union in aquatic species management: the shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) in the southern-eastern United States [J]. Cons Genet, 2002, 3: 155 - 166.
- [8] Smith C T, Nelson R J, Pollard S, et al. Population genetic analysis of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser River [J]. J Appl Ichthyol, 2002, 18 (4 - 6): 307 - 312.
- [9] Zhang S M, Wang D Q, Zhang Y P. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* [J]. Zoo Genet, 2003, 4: 673 - 683.
- [10] Brown J R, Beckenbach K, Beckenbach A T, et al. Length variation heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*) [J]. Genetics, 1996, 142: 525 - 535.
- [11] Birstein V J, Desalle R. Molecular phylogeny of Acipenseridae [J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 9: 141 - 155.
- [12] Comincin S, Lanfredi M, Rossi R, Fontana F. Use of RAPD markers to determine the genetic relationships among sturgeons (Acipenseridae, Pisces) [J]. Fish Sci, 1998, 64: 35 - 38.
- [13] 张四明, 邓 怀, 汪登强, 等. 7 种鲟形目鱼类亲缘关系的随机扩增多态性 DNA 研究 [J]. 自然科学进展, 1999, 9: 20 - 26.
- [14] 张四明, 张亚平, 郑向忠, 等. 12 种鲟形目鱼类 mtDNA ND4L-ND4 基因的序列的变异及其分子系统学 [J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(6): 607 - 614.
- [15] Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, et al. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish" [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 26: 110 - 120.
- [16] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478 - 484.
- [17] Broughton R E, Milam H E, Roe B A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J]. Genome Res, 2001, 11(11): 1958 - 1967.

PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA in thirteen species of Acipenseriformes

WANG Deng-qiang^{1,2}, WEI Qi-wei^{1,2}, WANG Chao-ming^{2,3}, LUO Xiao-song²

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology of Ministry of Agriculture, Jingzhou 434000, China; 2. Yangtze River Institute of Fisheries, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 3. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Acipenseriformes consists of 27 species, most of which are endangered. Although they have very high values in scientific research and economy, little is known about their phylogenetic relationship and evolution. In this research, 7 primer pairs were designed to amplify the sequences of mitochondrial DNA from the alcohol-preserved fin rays or muscles of eight species of Acipenseriformes by means of polymerase chain reaction technique. They are Chinese paddlefish (*Psephurus gladius*), paddlefish (*Polyodon spathula*), European huso sturgeon (*Huso huso*), Siberian huso sturgeon (*H. dauricus*), Chinese sturgeon (*A. sinensis*), Amur sturgeon (*A. schrenckii*), River sturgeon (*A. dabryanus*), sturgeon (*A. baerii*), Green Sturgeon (*A. medirois*), Shortnose sturgeon (*A. breviro*), Russian sturgeon (*A. guelden*), Adriatic sturgeon (*A. naccarii*) and Star sturgeon (*A. stellatus*).

The fragments amplified by the 7 prime pairs were marked as seg1, seg2, seg3, seg4, seg5, seg6 and seg7, the lengths of which were 3 kb, 2.6 kb, 2 kb, 2.4 kb, 2.2 kb, 2.5 kb and 2 kb, respectively. Their total length almost covered 97% of the complete sequences of the mitochondrial genome. The cleavage of seg4 by *Hae* III produced 19 fragments, while *Cfo* I had no cleavage site on seg2. The numbers of DNA electrophoresis bands produced by each amplified fragment were as follows: 42 for seg1, 24 for seg2, 27 for seg3, 47 for seg4, 36 for seg5, 33 for seg6 and 24 for seg7. All the segments had differences except seg2 and seg7, which were cut by *Cfo* I. From the data above, it can be seen that, seg4 obtained the most abundant DNA bands, and seg1 the second most, while the other segments obtained less without the inclusion of D-loop-containing seg6. This indicates that the genes encoding several subunits of NADH dehydrogenase (ND1, ND2, ND4, ND5 and ND6) have rather large variations in base number and higher rate of evolution, while those coding for the three subunits of cytochrome c oxidase (CO I, CO II, CO III) have rather small variations and slower rate. Of the 24 DNA electrophoresis bands obtained by the two rRNA genes in the eight species, only 14 showed differences, having the smallest variations. This indicates that rRNA genes are the most conservative in the evolution of mtDNA of Acipenseriformes.

Of the eight species, the genetic distance between *A. sinensis* and *A. dabryanus* is 0.0058, the smallest one, while that between *P. gladius* and *A. naccarii* is 0.0485, the largest one. The UPGMA molecular phylogenetic tree of the eight species constructed on the genetic distance was divided into two large branches: *P. gladius* and *P. spathula* formed a branch, whereas the other species another one. The latter was divided into two small ones: *A. sinensis* and *A. dabryanus* formed a small one, the other 4 sturgeon species another small one. However, *H. huso* and *H. dauricus* did not get together.

This study supports the research results on sequence analysis of ND4L-ND4 genes, but does not conform with those of analysis of 12 S and 16 S rRNA gene sequences and part of cytochrome *b* gene sequence. Besides, our results support the conclusion from all the molecular data, i.e., the extant two *Huso* sturgeon species cannot be classified as a separate *Huso*. However, the genetic distance between *P. gladius* and *P. spathula*, which belong to two different genera, is smaller than that among the species of *Acipenser*. This may be relevant to the endonucleases used in this experiment. More endonucleases should have been used so to provide more convenient conditions for researches on the genetic structures of mtDNA and sequencing the complete mt genome of Acipenseriformes.

Key words: Acipenseriformes; mitochondrial DNA; PCR-RFLP

Corresponding author: Wei Qi-wei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn