

Molecular Identification of a *Pseudogyrinocheilus prochilus* Population Distributed in Yezhong, Shuicheng County, Guizhou Province in China

Yaqi Miao^{1,2}, Shasha Zhang^{1,2}, Ting Li^{1,2}, Zhiyuan Zhao^{1,2}, Rongchuan Xiong^{1,2}

¹College of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Guizhou Liupanshui

²Minghu Laboratory, College of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Guizhou Liupanshui

Email: xiongrongchuan@126.com

Received: Sep. 9th, 2017; accepted: Sep. 23rd, 2017; published: Sep. 29th, 2017

Abstract

In June 9, 2015, a *Pseudogyrinocheilus prochilus* (Cyprinidae) fish specimen was collected from Beipan River (Pearl River System) in Yezhong Township, Shuicheng County, Liupanshui City, Guizhou Province in China. However, the *Pseudogyrinocheilus prochilus* fishes are usually recorded in the Yangtze River system in most scientific documentation. So, it needs further species delimitation based on molecular biological methods. Then DNA extraction and PCR experiments were conducted with the tissue of the specimen to amplify the mitochondrial 16S rRNA gene for further phylogenetic analysis and molecular identification. The results showed that the 16S rRNA gene sequence from the fish specimen in Yezhong was clustered into a monophyletic group with 3 homologous sequences of *Pseudogyrinocheilus prochilus*. The genetic distances between the target sequence and the other 3 *P. prochilus* ones (0.016) are lower than the most distances among related species (0.02 - 0.05) and higher than the ones within this species (0 - 0.01). Therefore, the Yezhong fish specimen was preliminary identified as *Pseudogyrinocheilus prochilus*. Its great genetic differentiation from other three populations of the Yangtze River system suggested distribution in different river system has a great role in the barrier for gene exchange among fish populations.

Keywords

Pseudogyrinocheilus prochilus, 16S rRNA, Molecular Identification, Yezhong

贵州野钟分布泉水鱼的分子鉴定

苗雅淇^{1,2}, 张沙沙^{1,2}, 李 婷^{1,2}, 赵志远^{1,2}, 熊荣川^{1,2}

¹六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州 六盘水

²六盘水师范学院生物科学与技术学院明湖实验室, 贵州 六盘水

Email: xiongrongchuan@126.com

收稿日期: 2017年9月9日; 录用日期: 2017年9月23日; 发布日期: 2017年9月29日

摘要

于2015年6月9日在贵州省六盘水市水城县野钟乡北盘江(珠江水系)中采集到一尾鲤科鱼类标本, 经初步形态鉴定为泉水鱼。然而, 之前文献多记载泉水鱼主要分布在长江水系, 因此有必要使用分子生物学研究方法做进一步的物种界定。对该标本的肌肉样本进行DNA提取及PCR实验, 扩增线粒体16S rRNA基因并进行系统发育分析。结果表明, 野钟鱼类样本16S rRNA基因序列与3条泉水鱼16S基因序列聚为一个单系, 且与其它3序列间的遗传距离(0.016)介于绝大部分泉水鱼及近缘物种间遗传距离(0.02~0.05)和种内遗传距离(0~0.01)之间。因此, 初步判断该标本属泉水鱼(*Pseudogyrinocheilus prochilus*), 与其它三个长江水系种群样本有较大的遗传分化, 暗示水系差异对于鱼类种群间基因交流有较大的阻隔作用。

关键词

泉水鱼, 16S rRNA, 分子鉴定, 野钟

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

泉水鱼(*Pseudogyrinocheilus prochilus*)属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)野鲮亚科(Labeoninae)泉水鱼属(*Pseudogyrinocheilus*), 是我国特有的一种鱼类[1]。分布地点为长江上游干流, 同时在四川境内的支流和乌江中也有分布[2]。本研究于2015年6月9日在贵州省六盘水市水城县野钟乡北盘江中采集到一尾鲤科鱼类标本, 经初步形态鉴定为泉水鱼(*Pseudogyrinocheilus prochilus*), 然而由于外形鉴别特征不明显, 加之该种鱼类较少有在珠江水系分布的文献记载, 因此有必要使用分子手段对其分类地位进行准确界定。另外, 目前有关于泉水鱼的文献记载, 多集中于细胞色素 b 基因序列[3]、遗传多样性[4]和核型[5]等方面的分析, 还没有使用线粒体 16S rRNA 基因对贵州省境内泉水鱼单一种群进行分子鉴定相关的报道。本文对采自贵州省六盘水市水城县野钟乡北盘江的泉水鱼标本进行 DNA 提取, 并克隆其线粒体 16S rRNA 基因片段, 使用分子系统发育学研究方法对其物种进行初步的分子鉴定。

2. 材料与方法

2.1. 标本信息

泉水鱼(*Pseudogyrinocheilus prochilus*)标本(图 1)为 2015 年 6 月 9 日采自贵州省六盘水市水城县野钟苗族彝族布依族乡北盘江江内(标本号: LPSSC2015060901), 保存于六盘水师范学院动物标本馆。



Figure 1. Lateral view, dorsum view and venter view of the specimen in this study

图 1. 本研究所用标本的侧面(上)、背面(中)及腹面照(下)

2.2. 总 DNA 提取及目的基因片段的扩增

取标本背部新鲜肌肉组织适量, 90%酒精固定后, 使用动物组织 DNA 提取试剂盒(FOREGENE, DE-05011: 250 Preps)提取总 DNA, -20°C 保存备用。

扩增引物 P7/P8, 为脊椎动物通用的线粒体 16S rRNA 基因片段扩增引物[6]。所扩增目的序列对应泉水鱼线粒体基因组(Genbank 索取号 KJ684987)2005-2577bp 区间位置, 对应泉水鱼 16S rRNA 全基因(Genbank 索取号 KJ684987)910-1482bp 区间位置。

PCR 反应条件: 反应体积为 50 ul, 其中北京全式金公司配备反应缓冲液 2×EasyTaq PCR SuperMix 25 ul, 总 DNA 模板 2 ul (含 10~100 ng), 上、下游引物各 2 ul (10 uM), 用 ddH₂O 补足 50 ul。扩增 PCR 反应程序为 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 40 s, 52°C 退火 40 s, 72°C 延伸 40 s, 循环次数为 35 次; 72°C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送测序公司测序。

2.3. 参考基因序列下载及系统发育分析

所测得的泉水鱼 16S 基因序列经过上传 GenBank 进行搜索比对(megablast)获得 100 条初步的参考序列, 与待定基因序列一起构成数据集 A。进行系统发育分析时不预先设定外群, 构建一棵无根系统发育树。用 MUSCLE [7]程序对序列进行比对, 辅以人工校对。在 MEGA6 [8]中筛选最适合该数据集序列演化模型以供最大似然法(Maximum likelihood, ML)分析和贝叶斯分析(Bayesian inference methods)。使用 MEGA6 [8]软件构建最大似然树(Maximum likelihood tree, ML tree), 根据 BIC 标准, 适合本数据集的模型 T92 + G + I。使用 MEGA6 构建最大似然树, 相应地设置模型为 Tamura 3-parameter model (T92), 在位点间速率变异模式(Rates among Sites)设置为 Gamma distributed with Invariant sites (G + I)。最大似然树支持率大于 75%表明该支系关系得到充分解决, 在 50%~70%之间为中度支持, 否则视为未解决。使用 Mrbayes3.2 [9]构建贝叶斯树(Bayesian inference tree, BI tree)。贝叶斯树支持率大于 95%表明该支系关系得到充分解决, 在 75%~95%之间为中度支持, 否则视为未解决。使用 MEGA6 [8]软件构建邻接树(Neighbor-Joining Tree, NJ tree)和最大简约树(Maximum Parsimony Tree, MP tree), 自举检验支持率大于 75%表明该支系关系得到充分解决, 在 50%~70%之间为中度支持, 否则视为未解决。

2.4. 遗传距离的计算

选用 MEGA6 [8], 依据 Kimura2-parameter 模型计算成对序列间的遗传距离。另外根据序列所属的物种名, 将数据集 A 的序列进行分组, 计算种间及种内的遗传距离。使用 R 语言基础包(base), 绘制种间及种内遗传距离数据的密度分布曲线, 探明泉水鱼及近缘物种在 16S 基因上的种间及种内遗传距离的主要分布区域。

3. 结果

3.1. PCR 扩增及测序结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 引物 P7/P8 扩增到 560 bp 左右的基因片段(GenBank 索取号: MF775291)。序列碱基组成存在明显的偏向性: AT 含量较高(A: 31.5%, T: 21.4%); GC 含量较低(G: 22.3%, C: 24.7%)。

3.2. 支系分化

将所测得泉水鱼 16S 基因序列提交 Genbank 进行搜索比对, 其与 Genbank 中的已有泉水鱼序列(KJ684987)相似度最高, 下载搜索得到的 100 条同源序列与待鉴定目标序列构成 16S 序列数据集 A。基于不同的分析方法(ML、BI、NJ、MP)对该数据集构建的系统发育树, 都支持本研究的自测序列(MF775291)与 3 条泉水鱼 16S 基因序列聚为一个单系(图 2, 泉水鱼支系, 序列基本信息见表 1), 然而该支系与其它支系(非泉水鱼支系)的聚类关系在各种方法构建的系统发育树间差异较大, 且支持率较低。

3.3. 遗传距离

基于 16S 基因序列的遗传距离表明, 泉水鱼支系内遗传距离为 0~0.016, 其它 3 条泉水鱼同源序列间的遗传距离为 0~0.004, 野钟样本 16S 基因序列与其他泉水鱼同源序列都为 0.016。种间及种内遗传距离数据的密度分布曲线(图 3)表明, 泉水鱼及近缘物种种内遗传距离主要分布在 0~0.01 之间, 种间遗传距离主要分布在 0.02~0.05 之间。

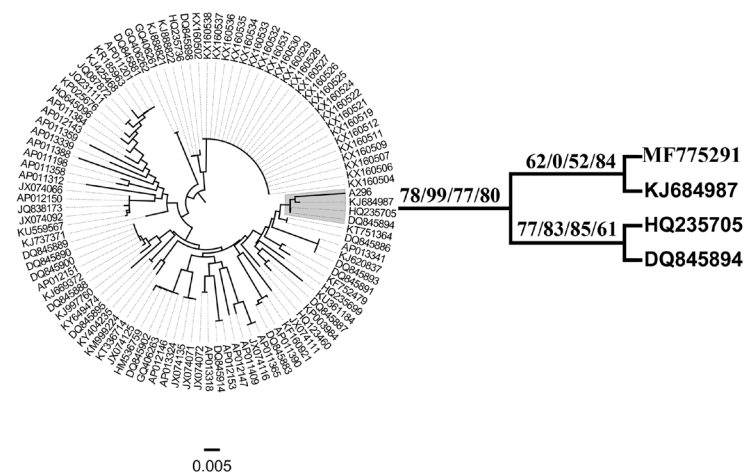
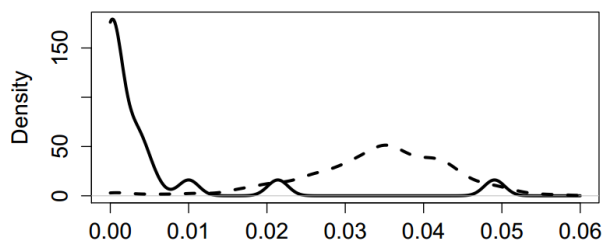


Figure 2. The neighbor-joining tree (ring topology) based on the dataset A and the *Pseudogyrinocheilus prochilus* clade with support rates under different analysis (ML bootstrap/Bayesian posterior probability/MP bootstrap/NJ bootstrap)

图 2. 基于数据集 A 构建的邻接树(环形树)及泉水鱼支系在不同方法构建的系统发育树中的支持率(最大似然率/贝叶斯后验概率/最大简约法自举检验支持率/邻接法自举检验支持率)

Table 1. The sequence information of *Pseudogyrinocheilus prochilus* specimens in this study**表 1.** 本研究所用泉水鱼标本序列信息

物种名	GenBank 索取号	标本号	采集地	数据来源
<i>P. prochilus</i>	MF775291	LPSSC2015060901	贵州水城	本研究
<i>P. prochilus</i>	KJ684987	NJNU:20130503301CS	贵州赤水	[10]
<i>P. prochilus</i>	HQ235705	未知	四川南充	[11]
<i>P. prochilus</i>	DQ845894	IHBCY0405017	四川攀枝花	[12]

**Figure 3.** The density distribution of genetic distances within a single species (the solid line) and between species (the dashed line) based on the dataset A**图 3.** 基于数据集 A 中种内(实线)及种间(虚线)遗传距离密度分布曲线

4. 讨论

本研究成功扩增了贵州省水城县野钟乡一鲤科鱼类标本的线粒体 16S rRNA 基因部分序列, 经过基于不同推断方法的系统发育分析, 其与 3 条泉水鱼同源序列以较高的支持率聚为一个独立支系, 其中, 最大似然率 77%, 贝叶斯后验概率为 99%, 贝叶斯法及邻接法自举检验值也都大于 75%, 证明该支系的单系性。因此可以初步判断该标本为泉水鱼(*Pseudogyrinocheilus prochilus*)。

从序列间的遗传距离结果看出, 野钟样本 16S 基因序列与其他泉水鱼同源序列的遗传距离都为 0.016, 远高于其它 3 条泉水鱼同源序列间的遗传距离(0~0.004)。同时, 种间及种内遗传距离数据的密度分布曲线(图 3)表明, 泉水鱼及近缘物种种内遗传距离主要分布在 0~0.01 之间, 种间遗传距离主要分布在 0.02~0.05 之间, 而野钟样本 16S 基因序列与其他泉水鱼同源序列的遗传距离(0.016)整体介于两者之间。另外, 在系统进化树上, 野钟样本和来自贵州赤水(KJ684987)、四川南充(HQ235705)以及四川攀枝花(DQ845894)聚为一个支持率较高的支系, 但是野钟样本序列并未形成独立支系或与其它种群序列有更为明确的聚类关系。这些结果暗示, 泉水鱼野钟种群和其它种群间有较大的遗传分化, 远超种内分化水平, 这可能与样本采集地所处的水系有一定的关系: 贵州赤水(KJ684987)、四川南充(HQ235705)以及四川攀枝花(DQ845894)同属于长江水系, 而野钟(北盘江)属于珠江水系。不同的水系可能对不同种群的基因交流有明显的隔离作用。然而, 这一明显的分化是否达到种间水平还需要更多的实验证据。

致 谢

感谢六盘水师范学院生物科学与技术学院田应洲教授及罗忠兴、李晓康同学在野外工作方面提供的帮助; 感谢生物科学与技术学院朱思瑾、张爽及张蓉等同学在实验室工作方面提供的帮助。

基金项目

国家自然科学基金(31360512); 贵州省科技厅自然科学基金(黔科合 J 字 LKLS[2013]06 号); 贵州省

教育厅自然科学研究重点项目(黔教合 KY 字[2015]387 号); 六盘水师范学院科技创新团队项目(LPSSYKJTD201602)。

参考文献 (References)

- [1] 乐佩琦. 中国动物志:硬骨鱼纲,鲤形目(下卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 丁瑞华. 四川鱼类志[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.
- [3] 司从利, 章群, 马奔, 等. 基于线粒体细胞色素 b 基因序列分析的泉水鱼遗传多样性研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(1): 6-8.
- [4] 史方, 徐念, 熊美华, 等. 利用微卫星标记评估乌江彭水水电站对泉水鱼的遗传多样性影响[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(2): 117-121.
- [5] 邹远超, 文正勇, 岳兴建, 等. 泉水鱼的细胞遗传学分析[J]. 动物学杂志, 2016, 51(1): 66-72.
- [6] Simons, C., Frati, F., Beckenbach, A., *et al.* (1994) Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- [7] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- [8] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., *et al.* (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- [9] Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., *et al.* (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, **61**, 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- [10] Yue, X., Shi, J. and Zou, Y. (2016) The Complete Mitochondrial Genome of *Pseudogyrinocheilus prochilus* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Mitochondrial DNA*, **27**, 824-825. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.919459>
- [11] 王绪祯, 甘小妮, 李俊兵, 等. 鲤亚科多倍体物种独立起源及其与第三纪青藏高原隆升的关系[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(11), 1277-1295.
- [12] Li, J., Wang, X., Kong, X., *et al.* (2008) Variation Patterns of the Mitochondrial 16S rRNA Gene with Secondary Structure Constraints and Their Application to Phylogeny of Cyprinine Fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **47**, 472-487. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.09.012>

Hans 汉斯

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ojs@hanspub.org