

文章编号:1674-7054(2012)01-0001-10

两种杂交石斑鱼子一代及其亲本的线粒体 CO I 基因遗传变异分析

周翰林¹ 杨 森¹ 高 川¹ 张 磊² 张海发² 李水生¹ 张 勇¹,
蒙子宁¹ 刘晓春¹ 林浩然^{1,3}

(1. 中山大学 生命科学学院 广东 广州 510275; 2. 广东省大亚湾水产试验中心 广东 惠州 516081;
3. 海南大学 海洋学院 海南 海口 570228)

摘 要: 对两种杂交石斑鱼子一代(青龙斑和虎龙斑)及其亲本(斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼)的线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I (CO I) 基因序列进行了测序分析。在 15 个样本中,同源序列片段(1 551 bp)中共检测到 9 个单倍型和 249 个核苷酸多态位点。序列差异分析和遗传距离比较结果显示,核苷酸序列同源性在 88.1% ~ 100% 之间,无明显遗传分化。虎龙斑的 2 个 CO I 基因单倍型与母本棕点石斑鱼单倍型的同源性为 99% 和 100%,而与父本鞍带石斑鱼的同源性均为 88.1%。青龙斑的 2 个单倍型与母本斜带石斑鱼的 3 个单倍型的同源性在 99.7% ~ 100% 之间,而与父本鞍带石斑鱼的同源性分别为 89.3% 和 89.4%。结果表明两种杂交子一代在线粒体 DNA CO I 基因上严格遵循母性遗传规律。

关键词: 斜带石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 棕点石斑鱼; 杂交子代; CO I; 遗传变异

中图分类号: Q 321

文献标志码: A

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)和棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)都隶属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*)。在我国主要分布于台湾海峡及南海海域^[1-5]。近年来,由于环境污染、过度捕捞而造成野生石斑鱼种群规模日趋缩小,种群质量逐年退化。此外,石斑鱼的人工繁殖仍面临巨大挑战,早在 20 世纪 80 年代,我国已开始进行赤点石斑与青石斑人工繁殖实验,但到目前为止其成活率依旧在 10% 以下,苗种规模化生产未能实现,严重制约了石斑鱼产业的发展。杂种优势普遍存在于生物有性生殖过程中,杂交后代生活力强、适应性广,有较强的抗逆力和竞争力。笔者利用人工授精的杂交方法,由斜带石斑鱼(♀)和鞍带石斑鱼(♂)杂交获得子一代青龙斑,由棕点石斑鱼(♀)和鞍带石斑鱼(♂)杂交获得子一代虎龙斑。本实验使用的杂交石斑鱼子一代在生长和抗病能力方面均呈现出杂种优势。然而,目前对于杂交石斑鱼子代的遗传背景鲜有报道。而对于遗传背景的分析研究有助于进行品种选育和遗传改良及资源的可持续开发利用。线粒体 DNA(mtDNA)是真核生物的核外遗传物质,具有基因组结果简单、编码效率高、进化速率快、无组织特异性和母系遗传等特性^[6]。细胞色素氧化酶 I(cytochrome oxidase subunit I,简称 CO I)是线粒体基因组中的一段,进化速率适中,是系统进化研究的良好标记^[7]。本研究对 2 种杂交石斑鱼子一代青龙斑和虎龙斑及其亲本斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼的 CO I 基因全序列进行了序列测定比对,为青龙斑和虎龙斑的 mtDNA 遗传效应的研究提供了理论依据。同时,对于石斑鱼杂交育种的遗传改良,选育新的优良品种都具有借鉴意义。

收稿日期: 2011-10-17

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903046); 国家自然科学基金面上项目(30871914); 广东省科技计划项目(2008B020800010, 2009B020308001, 2010B090400551, 2011B020307009); 广东省海洋渔业科技推广专项(A200800H01, A200900H01)

作者简介: 周翰林(1986-),男,中山大学生命科学学院水生经济动物研究所 2008 级硕士研究生。

通信作者: 林浩然,中国工程院院士。E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 实验用鱼为虎龙斑、青龙斑及其亲本斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼,均取自广东省大亚湾水产试验中心,每种 3 个 1 年龄个体,剪取鳍条保存于 $\varphi = 95\%$ 的酒精中。

1.2 方法 DNA 提取方法参照天根海洋动物组织 DNA 提试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit)说明,DNA 放置在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用,放置在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下做长期保存。扩增 *CO I* 全序列的引物序列为: *CO I*-F: TACAATCCACCGCTTAAACA, *CO I*-R: CGGTTATGTGTTGGCTTGA。反应总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中 ddH_2O $14.2\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{Buffer}$ $2\text{ }\mu\text{L}$, 25 mmol MgSO_4 $0.8\text{ }\mu\text{L}$,上游引物和下游引物各 $0.6\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{dNTP}$ $0.4\text{ }\mu\text{L}$,高保真型 KOD-PlusDNA 聚合酶 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ (购自 TOYOBOLJapan 公司), $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的模板 DNA $1\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min ,共进行 30 个循环;最后 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。PCR 产物使用 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测,使用 E. Z. N. A[®] Gel Extraction 胶回收试剂盒(Omega Bio-Tek USA 公司)进行回收纯化,然后采用 ABI3730 型自动测序仪测序(广州美晶生物公司)。

将测序结果用 DNASTar 软件包中的 Seqman 程序进行拼接,并以 Chromos 软件阅读测序峰值进行人工校对,舍弃掉两端信号低的序列,使用正反链序列进行互补检测,并结合测序峰图,对序列中的位点辅以人工矫正,以确保序列碱基的正确性。将校准过的序列在 NCBI 上进行 BLAST,验证所测得片段就是目标序列。最后将该校准的序列以 FASTA 格式文件保存。使用 Bioedit 软件比对序列并输出结果图片。运用 DNASTar 软件包中的 MegAlign 分析这些比对序列间的序列相似度和差异率。用 CLUSTAL X 1.8^[19] 软件对序列进行比对,输出文件形式 CLUSTAL 格式和 NEXUS 格式。将 CLUSTAL X 1.8 比对的结果即 .aln 文件输入到 MEGA4.0 软件中,转换为 MEGA 格式(.meg),通过 MEGA4.0^[20] 软件统计碱基含量、变异位点(Variablesites, *V*)、简约信息位点(parsimony informationsites, *Pi*)以及序列间碱基替换情况,采用 Kimura^[21] 双参数模型计算遗传距离,使用距离法构建 NJ 系统发育树。

2 结果与分析

2.1 *CO I* 基因的 PCR 结果 在斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑各 3 个个体中均扩增出约 $1\text{ }800\text{ bp}$ 的片段,包括部分的 *tRNA-Tyr* 基因序列和部分的 *tRNA-Ser* 基因序列,而同样条件下的空白对照未见扩增产物(图 1),说明结果可信。

2.2 *CO I* 基因序列及其碱基组成 对 PCR 扩增的片段进行序列测定,对比得到斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑 mtDNA *CO I* $1\text{ }551\text{ bp}$ 的碱基序列(除去部分 *tRNA-Tyr* 基因序列和部分的 *tRNA-Ser* 基因序列)。在上述的亲本和子代杂交石斑鱼的完整的 *CO I* 基因序列中,共检

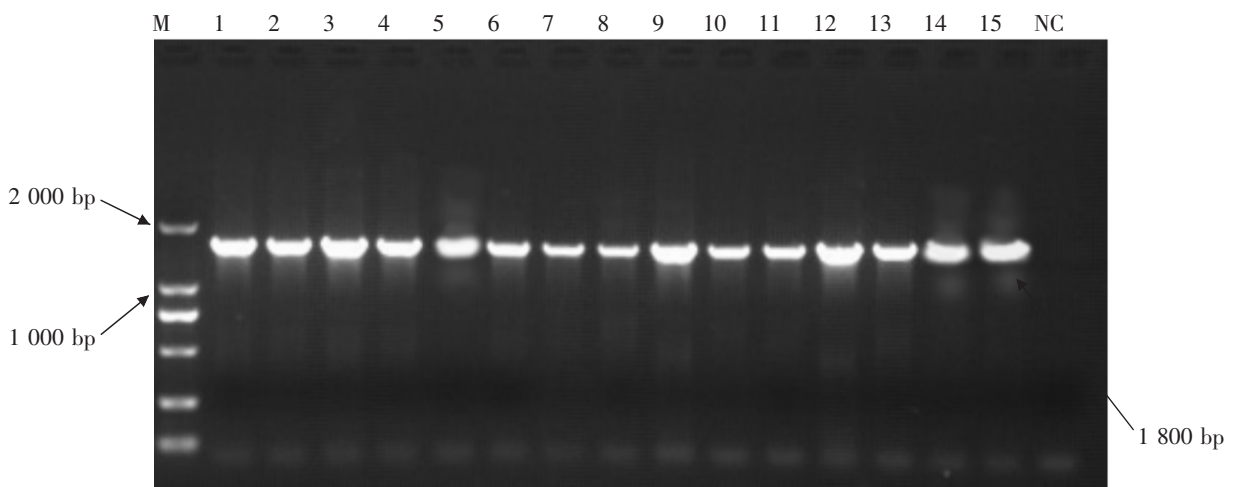


图 1 mtDNA *CO I* 基因片段 PCR 扩增结果

M 为 DNA $2\text{ }000\text{ bp}$ 相对分子质量标准,1~3 为斜带石斑鱼,4~6 为棕点石斑鱼,7~9 为鞍带石斑鱼,10~12 为青龙斑,13~15 为虎龙斑,NC 为阴性对照。

测到 249 个可变核苷酸位点 ,其中 153 个为简约信息位点 ,另外 1 302 个为保守核苷酸位点。棕点石斑鱼 3 个个体共享 1 个单倍型(EF) ,虎龙斑 2 个个体共享 1 个单倍型(FL - 1) ,另一虎龙斑个体(FL - 2) 与棕点石斑鱼序列完全一致 ,鞍带石斑鱼 3 个个体共享个 1 单倍型(EL) ,斜带石斑鱼 3 个个体共享 3 个单倍型(EC - 1 ,EC - 2 和 EC - 3) ,青龙斑 3 个个体共享 2 个单倍型(CL - 1 和 CL - 2) 。在比较的 5 种石斑鱼 15 个个体的 CO I 基因序列中 T ,C ,A ,G 碱基平均含量分别为 31. 1% ,26. 4 % ,25. 0% ,17. 5% 。其中 A + T 含量(56. 1%) 明显高于 G + C 含量(43. 9%) ,这与脊椎动物线粒体 DNA 轻链(light strand) 的碱基组成一致。

2.3 CO I 基因序列同源性分析 在斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑中的 CO I 基因核苷酸序列同源性在 88. 1% ~ 100% 之间。其中虎龙斑单倍型(FL - 1) 与母本棕点石斑鱼单倍型(EF) 的核苷酸序列同源性为 99. 9% ,虎龙斑单倍型(FL - 2) 与母本棕点石斑鱼单倍型(EF) 的同源性为 100% ,而虎龙斑 2 种单倍型(FL - 1 和 FL - 2) 与父本鞍带石斑鱼(EL) 的同源性均为 88. 1% 。青龙斑单倍型(CL - 1) 与母本斜带石斑鱼 3 个单倍型(EC - 1 ,EC - 2 和 EC - 3) 的核苷酸序列同源性分别为 99. 9% ,99. 7% 和 99. 9% ,青龙斑单倍型(CL - 2) 与母本斜带石斑鱼 3 个单倍型(EC - 1 ,EC - 2 和 EC - 3) 的同源性分别为 100% ,99. 7% 和 99. 9% ,而青龙斑 2 种单倍型(CL - 1 和 CL - 2) 与父本鞍带石斑鱼(EL) 的同源性分别为 89. 3% 和 89. 4%(见表 1) 。

表 1 5 种石斑鱼 mtDNA CO I 基因核苷酸序列同源性

石斑鱼品种	EF	FL - 1	FL - 2	EL	CL - 1	CL - 2	EC - 1	EC - 2	EC - 3
EF		99. 9	100	88. 1	90. 1	90. 1	90. 1	90. 1	90. 2
FL - 1			99. 9	88. 1	90. 1	90. 2	90. 2	90. 2	90. 3
FL - 2				88. 1	90. 1	90. 1	90. 1	90. 1	90. 2
EL					89. 3	89. 4	89. 4	89. 2	89. 3
CL - 1						99. 9	99. 9	99. 7	99. 9
CL - 2							100	99. 7	99. 9
EC - 1								99. 7	99. 9
EC - 2									99. 7
EC - 3									

注: EF 为棕点石斑鱼; FL 为虎龙斑; EL 为鞍带石斑鱼; CL 为青龙斑; EC 为斜带石斑鱼

2.4 CO I 基因序列的变异位点分析 分别分析杂交子代与父母本 CO I 基因单倍型的核苷酸序列的变异位点(如图 2) 。在虎龙斑单倍型(FL - 1) 与其母本棕点石斑鱼单倍型(EF) 和父本鞍带石斑鱼单倍型(EL) 分析中 ,发现 185 个变异位点 ,其中虎龙斑单倍型(FL - 1) 与其母本只有 1 个变异位点 ,即在第 705 位碱基均为 T ,而母本在此位点均为 C ,父本在此位点也均为 C。在虎龙斑单倍型(FL - 2) 与其母本棕点石斑鱼单倍型(EF) 和父本鞍带石斑鱼单倍型(EL) 分析中 ,发现 184 个变异位点 ,其中虎龙斑单倍型(FL - 2) 与其母本(EF) 序列完全一致。在青龙斑单倍型(CL - 1) 与其母本斜带石斑鱼 3 单倍型(EC - 1 ,EC - 2 和 EC - 3) 和父本鞍带石斑鱼单倍型(EL) 分析中 ,发现 170 个变异位点 ,其中青龙斑单倍型(CL - 1) 与其母本单倍型(EC - 1) 只有 1 个变异位点 ,即在第 705 位碱基为 T ,而母本和父本在此位点均为 G ,青龙斑单倍型(CL - 1) 与其母本单倍型(EC - 2) 有 5 个变异位点 ,即在第 462 ,478 ,625 ,642 ,936 位碱基分别为 A ,T ,T ,C ,T ,而母本在相应位点分别为 T ,G ,C ,T ,C ,父本在相应位点分别为 G ,G ,T ,C ,T ,青龙斑单倍型(CL - 1) 与其母本单倍型(EC - 3) 有 2 个变异位点 ,即在第 478 ,852 位碱基分别为 T ,A ,而母本在相应位点分别为 G ,G ,父本在相应位点分别为 G ,A。在青龙斑单倍型(CL - 2) 与其母本斜带石斑鱼 3 单倍型(EC - 1 ,EC - 2 和 EC - 3) 和父本鞍带石斑鱼单倍型(EL) 分析中 ,发现 169 个变异位点 ,青龙斑单倍型(CL - 2) 与其母本单倍型(EC - 1) 序列完全一致 ,青龙斑单倍型(CL - 2) 与其母本单倍型(EC - 2) 有 4 个变异位点 ,即在第 462 ,625 ,642 ,936 位碱基分别为 A ,T ,C ,T ,而母本在相应位点分别为 T ,C ,T ,C ,父本在相应位点分别为 G ,T ,C ,T ,青龙斑单倍型(CL - 2) 与其母本单倍型(EC - 3) 只有 1 个变异位点 ,即在第 852 位碱基均为 A ,而母本在相应位点均为 G ,父本在相应位点均为 A。

EF GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 FL-1 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 FL-2 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 EL GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGTACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGGCTGG 80
 CL-1 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 CL-2 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 EC-1 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 EC-2 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80
 EC-3 GTGGCCATCACACGTTGATTCTTCTCGACTAATCACAAAGACATTGGCACCCCTTATCTTGATTTGGTGCCTGAGCGG 80

EF TATGGTAGGAACAGCCCTCAGCCTGCTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGCTTACTAGGTGACGACCATGATCT 160
 FL-1 TATGGTAGGAACAGCCCTCAGCCTGCTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGCTTACTAGGTGACGACCATGATCT 160
 FL-2 TATGGTAGGAACAGCCCTCAGCCTGCTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGCTTACTAGGTGACGACCATGATCT 160
 EL GATAGTAGGAACAGCCCTTAGCTGCTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGCTTACTAGGTGATGACCATGATCT 160
 CL-1 AATAGTAGGAACAGCCCTTAGCCTACTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGAGCTCTACTAGGCGACGACCATGATCT 160
 CL-2 AATAGTAGGAACAGCCCTTAGCCTACTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGAGCTCTACTAGGCGACGACCATGATCT 160
 EC-1 AATAGTAGGAACAGCCCTTAGCCTACTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGAGCTCTACTAGGCGACGACCATGATCT 160
 EC-2 AATAGTAGGAACAGCCCTTAGCCTACTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGAGCTCTACTAGGCGACGACCATGATCT 160
 EC-3 AATAGTAGGAACAGCCCTTAGCCTACTAATTCGAGCTGAGCTTAGCCAACCAAGGGGAGCTCTACTAGGCGACGACCATGATCT 160

EF ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 FL-1 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 FL-2 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 EL ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGCTTTGGAAAT 240
 CL-1 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 CL-2 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 EC-1 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 EC-2 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGTGGCTTTGGAAAC 240
 EC-3 ATAATGTAATGTTACAGCACATGCTTTTGTAAATCTTTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGTGGCTTTGGAAAC 240

EF TGACTTATCCACTTATAATTGGCGCCCGAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 FL-1 TGACTTATCCACTTATAATTGGCGCCCGAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 FL-2 TGACTTATCCACTTATAATTGGCGCCCGAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 EL TGACTTATCCACTTATAATTGGTGGCCCGAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 CL-1 TGACTTATCCACTTATAATCGGTGCCCCAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 CL-2 TGACTTATCCACTTATAATCGGTGCCCCAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 EC-1 TGACTTATCCACTTATAATCGGTGCCCCAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 EC-2 TGACTTATCCACTTATAATCGGTGCCCCAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320
 EC-3 TGACTTATCCACTTATAATCGGTGCCCCAGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCCTCC 320

EF ATCCTTCCTGCTCTTCTCGCTTCTTCTGGAGTAGAAGCCGGTGCCGCTACTGGTTGAACGGTTTACCCACCCCTTAGCTG 400
 FL-1 ATCCTTCCTGCTCTTCTCGCTTCTTCTGGAGTAGAAGCCGGTGCCGCTACTGGTTGAACGGTTTACCCACCCCTTAGCTG 400
 FL-2 ATCCTTCCTGCTCTTCTCGCTTCTTCTGGAGTAGAAGCCGGTGCCGCTACTGGTTGAACGGTTTACCCACCCCTTAGCTG 400
 EL TTCTTCCTGCTCTTCTTGCCTCTTCTGGAGTAGAAGCTTGGTGTGGCACTGGCTGAACGGTCTACCCACCCCTTAGCTG 400
 CL-1 ATCCTTCCTGCTCTTCTTGCCTCTTCTGGGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGGCCG 400
 CL-2 ATCCTTCCTGCTCTTCTTGCCTCTTCTGGGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGGCCG 400
 EC-1 ATCCTTCCTGCTCTTCTTGCCTCTTCTGGGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGGCCG 400
 EC-2 ATCCTTCCTGCTCTTCTTGCCTCTTCTGGGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGGCCG 400
 EC-3 ATCCTTCCTGCTCTTCTTGCCTCTTCTGGGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGGCCG 400

EF GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 FL-1 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 FL-2 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 EL GAAATCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 CL-1 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 CL-2 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 EC-1 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 EC-2 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480
 EC-3 GAAACCTAGCCCATGCAGGTGCATCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT 480

EF	ATCCTTCCTGCTCCTTCTCGGCTTCTTCTGAGTAGAAGCCGGTGCCGGTACTGGTTGAACGGTTTACCCACCCCTTAGCTG	400
FL-1	ATCCTTCCTGCTCCTTCTCGGCTTCTTCTGAGTAGAAGCCGGTGCCGGTACTGGTTGAACGGTTTACCCACCCCTTAGCTG	400
FL-2	ATCCTTCCTGCTCCTTCTCGGCTTCTTCTGAGTAGAAGCCGGTGCCGGTACTGGTTGAACGGTTTACCCACCCCTTAGCTG	400
EL	TTCTTTCTGCTTCTTCTTGCCTCTCTGAGTAGAAGCTGGTGTGGCACTGGCTGAACGGTCTACCCACCCCTTAGCCG	400
CL-1	ATCCTTCCTGCTTCTTCTTGCCTCTTCTGGTGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGCCG	400
CL-2	ATCCTTCCTGCTTCTTCTTGCCTCTTCTGGTGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGCCG	400
EC-1	ATCCTTCCTGCTTCTTCTTGCCTCTTCTGGTGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGCCG	400
EC-2	ATCCTTCCTGCTTCTTCTTGCCTCTTCTGGTGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGCCG	400
EC-3	ATCCTTCCTGCTTCTTCTTGCCTCTTCTGGTGTAGAAGCCGGTGCTGGCACTGGCTGAACAGTCTACCCACCCCTTGCCG	400
EF	GAAACTTAGCCCATGTCAGGTGCATCCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT	480
FL-1	GAAACTTAGCCCATGTCAGGTGCATCCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT	480
FL-2	GAAACTTAGCCCATGTCAGGTGCATCCGTAGACTTAACCATCTTCTCACTACATCTAGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT	480
EL	GAAACTTAGCCCATGTCAGGTGCATCTGAGACTTAACATCTTCTCACTACATCTGGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGT	480
CL-1	GAAACCTAGCCACGCAGGTGCATCAGTAGACTTAACATTTTCTCACTACATTTAGCGGGAATTTTCATCAATTCTAGGT	480
CL-2	GAAACCTAGCCACGCAGGTGCATCAGTAGACTTAACATTTTCTCACTACATTTAGCGGGAATTTTCATCAATTCTAGGT	480
EC-1	GAAACCTAGCCACGCAGGTGCATCAGTAGACTTAACATTTTCTCACTACATTTAGCGGGAATTTTCATCAATTCTAGGT	480
EC-2	GAAACCTAGCCACGCAGGTGCATCAGTAGACTTAACATTTTCTCACTACATTTAGCGGGAATTTTCATCAATTCTAGGT	480
EC-3	GAAACCTAGCCACGCAGGTGCATCAGTAGACTTAACATTTTCTCACTACATTTAGCGGGAATTTTCATCAATTCTAGGT	480
EF	GCAATTAACCTTTATTACAACCATTAATAATATAAAACCCCTGCTATCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTATGAGC	560
FL-1	GCAATTAACCTTTATTACAACCATTAATAATATAAAACCCCTGCTATCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTATGAGC	560
FL-2	GCAATTAACCTTTATTACAACCATTAATAATATAAAACCCCTGCTATCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTATGAGC	560
EL	GCAATTAACCTTTATTACAACCATTAATAATATAAAACCCCTGCTATCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTATGAGC	560
CL-1	GCAATCAACTTTATCACAACCATTAATAATGAAACCTCCTGCTACCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTGTGAGC	560
CL-2	GCAATCAACTTTATCACAACCATTAATAATGAAACCTCCTGCTACCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTGTGAGC	560
EC-1	GCAATCAACTTTATCACAACCATTAATAATGAAACCTCCTGCTACCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTGTGAGC	560
EC-2	GCAATCAACTTTATCACAACCATTAATAATGAAACCTCCTGCTACCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTGTGAGC	560
EC-3	GCAATCAACTTTATCACAACCATTAATAATGAAACCTCCTGCTACCTCTCAATACCAAAACACCTTTATTTGTGTGAGC	560
EF	TGTATTAATTACAGCCGTGCTTCTACTCCTCTCTCTTCCCGTTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
FL-1	TGTATTAATTACAGCCGTGCTTCTACTCCTCTCTCTTCCCGTTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
FL-2	TGTATTAATTACAGCCGTGCTTCTACTCCTCTCTCTTCCCGTTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
EL	TGTATTAATTACAGCAGTACTCTACTCCTCTCTCTTCCCGTTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
CL-1	AGTATTGATTACAGCAGTACTCTACTCCTTTCCCTTCCCGTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
CL-2	AGTATTGATTACAGCAGTACTCTACTCCTTTCCCTTCCCGTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
EC-1	AGTATTGATTACAGCAGTACTCTACTCCTTTCCCTTCCCGTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
EC-2	AGTATTGATTACAGCAGTACTCTACTCCTTTCCCTTCCCGTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
EC-3	AGTATTGATTACAGCAGTACTCTACTCCTTTCCCTTCCCGTCTTGCCGGTGGCATTACAATGTTACTCAGATCGTA	640
EF	ACCTTAACACTACTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGTATTCTTTACCAACATTTATTCTGATTCTTTGGTCAC	720
FL-1	ACCTTAACACTACTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGTATTCTTTACCAACATTTATTCTGATTCTTTGGTCAC	720
FL-2	ACCTTAACACTACTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGTATTCTTTACCAACATTTATTCTGATTCTTTGGTCAC	720
EL	ACCTTAACACTACTTCTTTGATCCAGCCGAGGAGGAGATCCAAATCTTTACCAGCACTTGTCTGATTCTTCGGCCAC	720
CL-1	ACCTTAATACCACTTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGATTCTTTACCAGCACTTATTTGATTCTTCGGCCAC	720
CL-2	ACCTTAATACCACTTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGATTCTTTACCAGCACTTATTTGATTCTTCGGCCAC	720
EC-1	ACCTTAATACCACTTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGATTCTTTACCAGCACTTATTTGATTCTTCGGCCAC	720
EC-2	ACCTTAATACCACTTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGATTCTTTACCAGCACTTATTTGATTCTTCGGCCAC	720
EC-3	ACCTTAATACCACTTTCTTTGACCCAGCCGAGGGGGAGACCGATTCTTTACCAGCACTTATTTGATTCTTCGGCCAC	720
EF	CCGAGGTTTACATTTTGATTCTCCTGGTTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTACTCTGGGAAAAAAGAACC	800
FL-1	CCGAGGTTTACATTTTGATTCTCCTGGTTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTACTCTGGGAAAAAAGAACC	800
FL-2	CCGAGGTTTACATTTTGATTCTCCTGGTTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTACTCTGGGAAAAAAGAACC	800
EL	CCAGAGGTTTACATTTTGATTCTCCTGGTTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGGCTACTCTGGGAAAAAAGAACC	800
CL-1	CCAGAGGTTTATATTCTTATTCTTCTGGCTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTATTCCGGTAAAAAAGAACC	800
CL-2	CCAGAGGTTTATATTCTTATTCTTCTGGCTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTATTCCGGTAAAAAAGAACC	800
EC-1	CCAGAGGTTTATATTCTTATTCTTCTGGCTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTATTCCGGTAAAAAAGAACC	800
EC-2	CCAGAGGTTTATATTCTTATTCTTCTGGCTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTATTCCGGTAAAAAAGAACC	800
EC-3	CCAGAGGTTTATATTCTTATTCTTCTGGCTTCGGAATGATCTCCACATCGTTGCATATTATTCCGGTAAAAAAGAACC	800

EF	CTTTGGCTATATAGGAATGGTTTGAGCCATAATAGCAATTGGCCTTCTAGGGTTTATCGTATGAGCACACCACATGTTTA	880
FL-1	CTTTGGCTATATAGGAATGGTTTGAGCCATAATAGCAATTGGCCTTCTAGGGTTTATCGTATGAGCACACCACATGTTTA	880
FL-2	CTTTGGCTATATAGGAATGGTTTGAGCCATAATAGCAATTGGCCTTCTAGGGTTTATCGTATGAGCACACCACATGTTTA	880
EL	ATTTGGTTATATAGGAATGGTTTGAGCCATAATAGCAATTGGCCTTCTAGGATTATTGTGTGAGCACACCACATGTTTA	880
CL-1	ATTTGGCTATATAGGAATAGTTTGAGCCATAATGGCAATTGGCCTTCTAGGATTCAATTGTATGAGCACATCACATGTTTA	880
CL-2	ATTTGGCTATATAGGAATAGTTTGAGCCATAATGGCAATTGGCCTTCTAGGATTCAATTGTATGAGCACATCACATGTTTA	880
EC-1	ATTTGGCTATATAGGAATAGTTTGAGCCATAATGGCAATTGGCCTTCTAGGATTCAATTGTATGAGCACATCACATGTTTA	880
EC-2	ATTTGGCTATATAGGAATAGTTTGAGCCATAATGGCAATTGGCCTTCTAGGATTCAATTGTATGAGCACATCACATGTTTA	880
EC-3	ATTTGGCTATATAGGAATAGTTTGAGCCATAATGGCAATTGGCCTTCTAGGATTCAATTGTATGAGCACATCACATGTTTA	880
EF	CAGTTGGAATAGACGTGGATACACGTGCCCTACTTTACATCAGCTACTATGATTATCGCAATCCCCTGGTGTAAAAGTC	960
FL-1	CAGTTGGAATAGACGTGGATACACGTGCCCTACTTTACATCAGCTACTATGATTATCGCAATCCCCTGGTGTAAAAGTC	960
FL-2	CAGTTGGAATAGACGTGGATACACGTGCCCTACTTTACATCAGCTACTATGATTATCGCAATCCCCTGGTGTAAAAGTC	960
EL	CAGTTGGTTATAGATTGAGACACACCGGCTTATTTACATCAGCTACTATAATTATTGCAATCCCCTGGCGTTAAAGTC	960
CL-1	CGGTTGGAATAGACGTAGACACACGTGCTTACTTTACATCAGCTACTATAATTATTGCAATCCCCTGGCGTTAAAGTC	960
CL-2	CGGTTGGAATAGACGTAGACACACGTGCTTACTTTACATCAGCTACTATAATTATTGCAATCCCCTGGCGTTAAAGTC	960
EC-1	CGGTTGGAATAGACGTAGACACACGTGCTTACTTTACATCAGCTACTATAATTATTGCAATCCCCTGGCGTTAAAGTC	960
EC-2	CGGTTGGAATAGACGTAGACACACGTGCTTACTTTACATCAGCTACTATAATTATTGCAATCCCCTGGCGTTAAAGTC	960
EC-3	CGGTTGGAATAGACGTAGACACACGTGCTTACTTTACATCAGCTACTATAATTATTGCAATCCCCTGGCGTTAAAGTC	960
EF	TTCAGCTGACTAGCTACGCTTCACGGAGGGTCAATTAATAGAGAAACCCCTCTTTATGAGCACTTGGTTTATTTTCCT	1040
FL-1	TTCAGCTGACTAGCTACGCTTCACGGAGGGTCAATTAATAGAGAAACCCCTCTTTATGAGCACTTGGTTTATTTTCCT	1040
FL-2	TTCAGCTGACTAGCTACGCTTCACGGAGGGTCAATTAATAGAGAAACCCCTCTTTATGAGCACTTGGTTTATTTTCCT	1040
EL	TTTAGCTGACTAGCCACACTTCATGAGGAAACATTAATAGAGAACCCCTCTATGGGCACTTGGCTTTATTTTCCT	1040
CL-1	TTCAGCTGATTGGCTACGCTTCACGGAGGGTCCATTAAATAGAGAAACCCCTCCTATGGGCACTCGGCTTTATTTTCCT	1040
CL-2	TTCAGCTGATTGGCTACGCTTCACGGAGGGTCCATTAAATAGAGAAACCCCTCCTATGGGCACTCGGCTTTATTTTCCT	1040
EC-1	TTCAGCTGATTGGCTACGCTTCACGGAGGGTCCATTAAATAGAGAAACCCCTCCTATGGGCACTCGGCTTTATTTTCCT	1040
EC-2	TTCAGCTGATTGGCTACGCTTCACGGAGGGTCCATTAAATAGAGAAACCCCTCCTATGGGCACTCGGCTTTATTTTCCT	1040
EC-3	TTCAGCTGATTGGCTACGCTTCACGGAGGGTCCATTAAATAGAGAAACCCCTCCTATGGGCACTCGGCTTTATTTTCCT	1040
EF	TTTACAGTGGGAGGTTTAAACAGGAATTGTTCTAGCTAACTCTTCACTTGATATTGTGCTACACGATACATACTATGTAG	1120
FL-1	TTTACAGTGGGAGGTTTAAACAGGAATTGTTCTAGCTAACTCTTCACTTGATATTGTGCTACACGATACATACTATGTAG	1120
FL-2	TTTACAGTGGGAGGTTTAAACAGGAATTGTTCTAGCTAACTCTTCACTTGATATTGTGCTACACGATACATACTATGTAG	1120
EL	TTTACAGTAGGAGGTTTAAACAGGAATTGCTCTAGCCAACTCTTCACTCGATATTGTGCTACACGATACATACTATGTAG	1120
CL-1	CTTTACAGTAGGGGGTCTAACGGGAATTGCTCTAGCTAATTCTTCACTCGACATTGTCTTACACGATACATACTATGTAG	1120
CL-2	CTTTACAGTAGGGGGTCTAACGGGAATTGCTCTAGCTAATTCTTCACTCGACATTGTCTTACACGATACATACTATGTAG	1120
EC-1	CTTTACAGTAGGGGGTCTAACGGGAATTGCTCTAGCTAATTCTTCACTCGACATTGTCTTACACGATACATACTATGTAG	1120
EC-2	CTTTACAGTAGGGGGTCTAACGGGAATTGCTCTAGCTAATTCTTCACTCGACATTGTCTTACACGATACATACTATGTAG	1120
EC-3	CTTTACAGTAGGGGGTCTAACGGGAATTGCTCTAGCTAATTCTTCACTCGACATTGTCTTACACGATACATACTATGTAG	1120
EF	TTGCCCACTTCCACTACGTACTCTCAATAGGAGCCGTAATTGCCATCGTAGCTGCCTTCGTACACTGATTCCCTCTGTTT	1200
FL-1	TTGCCCACTTCCACTACGTACTCTCAATAGGAGCCGTAATTGCCATCGTAGCTGCCTTCGTACACTGATTCCCTCTGTTT	1200
FL-2	TTGCCCACTTCCACTACGTACTCTCAATAGGAGCCGTAATTGCCATCGTAGCTGCCTTCGTACACTGATTCCCTCTGTTT	1200
EL	TTGCCCACTTCCATTATGTGCTCTCCATAGGAGCCGTTTCGCCATCGTAGCTGCCTTCGTACACTGATTCCCACTATT	1200
CL-1	TTGCCCACTTCCACTATGTACTCTCAATGGGAGCCGTTTGGCATTGTAGCTGCCTTTGTACACTGATTCCCACTATT	1200
CL-2	TTGCCCACTTCCACTATGTACTCTCAATGGGAGCCGTTTGGCATTGTAGCTGCCTTTGTACACTGATTCCCACTATT	1200
EC-1	TTGCCCACTTCCACTATGTACTCTCAATGGGAGCCGTTTGGCATTGTAGCTGCCTTTGTACACTGATTCCCACTATT	1200
EC-2	TTGCCCACTTCCACTATGTACTCTCAATGGGAGCCGTTTGGCATTGTAGCTGCCTTTGTACACTGATTCCCACTATT	1200
EC-3	TTGCCCACTTCCACTATGTACTCTCAATGGGAGCCGTTTGGCATTGTAGCTGCCTTTGTACACTGATTCCCACTATT	1200
EF	ACAGGCTACACCTCCACAGCACCTGAACAAAAATTCACCTTTGGCATTATATTGGTGGGTGTTAACTCACCCTCTTCCC	1280
FL-1	ACAGGCTACACCTCCACAGCACCTGAACAAAAATTCACCTTTGGCATTATATTGGTGGGTGTTAACTCACCCTCTTCCC	1280
FL-2	ACAGGCTACACCTCCACAGCACCTGAACAAAAATTCACCTTTGGCATTATATTGGTGGGTGTTAACTCACCCTCTTCCC	1280
EL	TCAGGCTACACCTTCATAGCACCTGAACAAAAATCCACTTTGGCATTATGTTTGTAGGTGTAACCTCACCCTCTTCCC	1280
CL-1	ACAGGCTACACTTTCATAGCACCTGAACAAAAATCCACTTTGGCATTATGTTTGTAGGTGTAACCTCACCCTCTTCCC	1280
CL-2	ACAGGCTACACTTTCATAGCACCTGAACAAAAATCCACTTTGGCATTATGTTTGTAGGTGTAACCTCACCCTCTTCCC	1280
EC-1	ACAGGCTACACTTTCATAGCACCTGAACAAAAATCCACTTTGGCATTATGTTTGTAGGTGTAACCTCACCCTCTTCCC	1280
EC-2	ACAGGCTACACTTTCATAGCACCTGAACAAAAATCCACTTTGGCATTATGTTTGTAGGTGTAACCTCACCCTCTTCCC	1280
EC-3	ACAGGCTACACTTTCATAGCACCTGAACAAAAATCCACTTTGGCATTATGTTTGTAGGTGTAACCTCACCCTCTTCCC	1280

EF	TCAACATTTCTAGGCTTAGCTGGAATGCCCGTCGATACTCAGACTACCCAGATGCCTACACCTATGAAACACCGTCT	1360
FL-1	TCAACATTTCTAGGCTTAGCTGGAATGCCCGTCGATACTCAGACTACCCAGATGCCTACACCTATGAAACACCGTCT	1360
FL-2	TCAACATTTCTAGGCTTAGCTGGAATGCCCGTCGATACTCAGACTACCCAGATGCCTACACCTATGAAACACCGTCT	1360
EL	TCAACACTTCTTAGGGCTAGCCGGAATACCTCGTCGATACTCAGACTACCCAGACGCCTATACCTCTGAAATACTGTCT	1360
CL-1	TCAACACTTCTTAGGGCTAGCCGGAATACCTCGTCGATACTCAGACTACCCAGACGCCTATACCTCTGAAATACTGTCT	1360
CL-2	TCAACACTTCTTAGGGCTAGCCGGAATACCTCGTCGATACTCAGACTACCCAGACGCCTATACCTCTGAAATACTGTCT	1360
EC-1	TCAACACTTCTTAGGGCTAGCCGGAATACCTCGTCGATACTCAGACTACCCAGACGCCTATACCTCTGAAATACTGTCT	1360
EC-2	TCAACACTTCTTAGGGCTAGCCGGAATACCTCGTCGATACTCAGACTACCCAGACGCCTATACCTCTGAAATACTGTCT	1360
EC-3	TCAACACTTCTTAGGGCTAGCCGGAATACCTCGTCGATACTCAGACTACCCAGACGCCTATACCTCTGAAATACTGTCT	1360
EF	CTTCTGTCGGCTCTATAATCTCGCTCGTAGCTGTAATTATGTTCTTTTCATTATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
FL-1	CTTCTGTCGGCTCTATAATCTCGCTCGTAGCTGTAATTATGTTCTTTTCATTATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
FL-2	CTTCTGTCGGCTCTATAATCTCGCTCGTAGCTGTAATTATGTTCTTTTCATTATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
EL	CCTCTATTGGCTCTATGATCTCACTCGTAGCTGTAATTATGTTCTTTTCATTATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
CL-1	CTTCTATTGGCTCTATAATCTCACTCGTGGCCGTAATTATATTCCTTTTCATCATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
CL-2	CTTCTATTGGCTCTATAATCTCACTCGTGGCCGTAATTATATTCCTTTTCATCATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
EC-1	CTTCTATTGGCTCTATAATCTCACTCGTGGCCGTAATTATATTCCTTTTCATCATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
EC-2	CTTCTATTGGCTCTATAATCTCACTCGTGGCCGTAATTATATTCCTTTTCATCATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
EC-3	CTTCTATTGGCTCTATAATCTCACTCGTGGCCGTAATTATATTCCTTTTCATCATCTGAGAAGCATTGCTTCTAAACGT	1440
EF	GAAGTCTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCATGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
FL-1	GAAGTCTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCATGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
FL-2	GAAGTCTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCATGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
EL	GAAGTCTTGCAGTAGAACTGACCTCAACCAACGTAGAATGACTCCACGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
CL-1	GAAGTACTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCACGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
CL-2	GAAGTACTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCACGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
EC-1	GAAGTACTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCACGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
EC-2	GAAGTACTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCACGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
EC-3	GAAGTACTTGCAGTAGAACTAACCATGACCAACGTAGAATGACTCCACGGCTGCCCTCCCCCATAACACACATTTCGAGGA	1520
EF	ACCTGCTTTTGTTCAAATTCGATCATACTAA	1551
FL-1	ACCTGCTTTTGTTCAAATTCGATCATACTAA	1551
FL-2	ACCTGCTTTTGTTCAAATTCGATCATACTAA	1551
EL	ACCCGCATTGTTCAAATTCGACCATCTAA	1551
CL-1	GCCCCGATTGTTCAAATTCGACCATACTAA	1551
CL-2	GCCCCGATTGTTCAAATTCGACCATACTAA	1551
EC-1	GCCCCGATTGTTCAAATTCGACCATACTAA	1551
EC-2	GCCCCGATTGTTCAAATTCGACCATACTAA	1551
EC-3	GCCCCGATTGTTCAAATTCGACCATACTAA	1551

图 2 5 种石斑鱼的 9 种单倍型的 mtDNA *CO I* 基因核苷酸序列比对

2.5 *CO I* 基因的系统进化树分析

用测得的斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑的 *CO I* 基因单倍型核苷酸序列构建进化树。根据 Kimura's Two-Parameter Method^[21] 估计每个核苷酸位点的碱基替换数,以鞍带石斑鱼为外群,用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建以上 5 种石斑鱼的系统进化树,结果见图 3。

3 讨论

动物线粒体 DNA(mtDNA)通

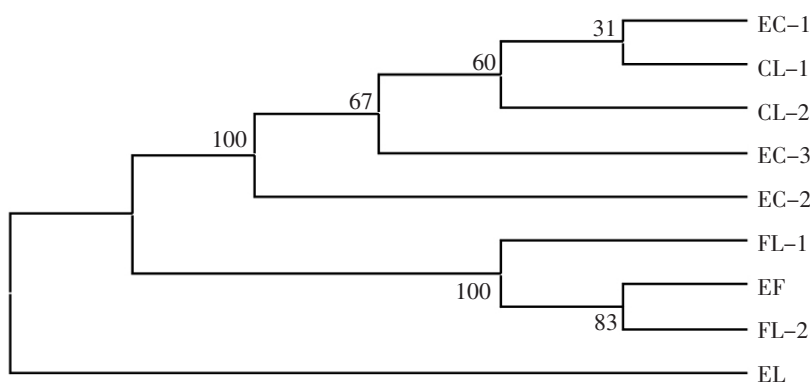


图 3 邻接法构建 5 种石斑鱼 mtDNA *CO I* 基因系统进化树
图中数字代表 1 000 个重复的 bootstrape 值,水平线代表遗传距离。
EF 为棕点石斑鱼; FL 为虎龙斑; EL 为鞍带石斑鱼; CL 为青龙斑;
EC 为斜带石斑鱼。

常是遵循母性遗传规律的,然而,随着许多研究的开展,分别在人(*Homo sapiens*)^[8-9]、小家鼠(*Mus musculus*)^[10]、羊(*Ovis aries*)^[11]等哺乳动物,鸟类大山雀(*Parus major*)^[12]、比目鱼(*Platichthys flesus*)^[18]、蜜蜂(*Apis mellifera*)^[13]、果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[14]、鳞翅类(*lepidopteran*)^[15]等昆虫,贻贝属(*Mytilus*)和蚌科(*Unionidae*)部分种类^[16]、蛛网缀锦蛤(*Tapes philippinarum*)^[17]等软体动物中发现了不同程度的父性遗传现象。例如,Meusel等通过对果蝇的研究发现,实验的16个家系中有14个家系存在父性mtDNA^[14]。Kaned等^[22]对小家鼠(*Mus musculus*)和地中海小家鼠(*Mus spretus*)进行种内和种间杂交实验时,研究发现在种内交配中父本的线粒体DNA可存留至原核期末,而在种间杂交中父本的线粒体DNA至少可以保留至胎儿出生。由于mtDNA父性遗传的存在,提醒人们在进行进化、分类、疾病及动物经济性状的研究中还应考虑mtDNA的父性遗传效应^[23]。鱼类mtDNA是经常用来分析杂种遗传特征的分子标记。在鱼类杂交过程中,mtDNA既有母性遗传现象,同时也存在父性遗传的重组或渐渗的特殊情况。郭新红^[23]对异源四倍体鲫鱼、三倍体湘云鲫及其亲本进行mtDNA全序列测序,比较发现以日本白鲫(*Carassium auratus cuvieri*)为母本和异源四倍体鲫鱼为父本交配得到的三倍体湘云鲫的mtDNA存在父性遗传现象,并且推测在tRNA-Va→NADH5基因这一区间,三倍体湘云鲫的母本日本白鲫和父本异源四倍体鲫鱼的mtDNA之间发生了遗传重组,但母本红鲫(*Carassium auratus redvar.*)与父本湘江野鲤(*Cyprinus carpio* L.)的杂交后代异源四倍体鲫鱼的mtDNA具有严格的母性遗传特征,可见在不同倍性鱼类中,mtDNA既有严格的母性遗传现象,同时也存在父性遗传的特殊情况。徐晖等^[24]分析了雌性褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)和雄性夏牙鲈(*P. dentatus*)及其杂交子一代的线粒体DNA 16S rRNA基因部分序列的遗传特性,结果表明,杂种子一代和母本褐牙鲈为同一单倍型,遵循母性遗传的特征。

mtDNA是动物体内惟一的核外遗传物质,拷贝数多,突变率高,mtDNA的速率进化一般比核单拷贝基因的快5~10倍^[25],并且不同区域进化速率不一致,因而在海洋动物的分类、遗传变异分析和系统进化等领域应用广泛。其中,尤其以编码线粒体细胞色素C氧化酶亚基1的基因在海洋动物分子系统学的研究中应用较为广泛^[26]。而线粒体CO I基因也是在动物中最常用的DNA条形码^[27]。Robert D Ward等^[28]使用655 bp的CO I基因序列鉴别澳大利亚的207种海水鱼,其中包括斜带石斑鱼(*E. coioides*)和鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*),研究表明,CO I基因序列可作为DNA条形码用来鉴定鱼类。本实验室已使用CO I基因全序列对棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)和鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)进行群体遗传分析,对比CO I序列,表明CO I基因在种群内变异较小,种间变异较大,可鉴别这2种石斑鱼。

本研究对杂交石斑鱼子一代青龙斑和虎龙斑及其亲本斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼进行CO I基因全序列遗传分析,采用PCR产物纯化后直接测序,观察测序图是否有双峰叠加,用以检测杂交子一代中是否含有父本的CO I基因,基于DNA测序仪的工作原理和测序反应的特点,若是杂交子一代的相同基因将检测出2种不同的碱基,其中1个来自父本,另一个来自母本,那么,在原始测序图上,将呈现出这2种碱基的峰的叠加^[29],进一步分析测得的杂交子一代单一序列并与父母本的进行对比,用以检测是否出现父母本CO I基因的重组或者渐渗。本研究使用相同的引物和条件扩增上述5种石斑鱼CO I基因,PCR产物条带清晰,测序图无杂峰或者重叠双峰现象。青龙斑和虎龙斑的CO I基因单倍型与母本棕点石斑鱼单倍型的同源性达到97%~100%,其中虎龙斑单倍型(FL-2)与其母本(EF)序列完全一致,青龙斑单倍型(CL-2)与其母本单倍型(EC-1)序列完全一致,而与父本鞍带石斑鱼单倍型的同源性只有88.1%~89.4%(见表1)。尽管杂交子一代有些位点碱基与母本不同而与父本相同,但是与母本不同的位点最多的只有5个(青龙斑单倍型(CL-1)与其母本单倍型(EC-2)),并且分散分布,因此不是由于父本mtDNA的重组引起的,这可能是由于其原始母本CO I基因的个体差异造成的或者由人工育种造成的点突变。研究结果说明,杂交子一代青龙斑和虎龙斑与母本斜带石斑鱼和棕点石斑鱼之间的CO I基因全序列为种内变异水平,与父本鞍带石斑鱼的差异为种间变异水平,表明斜带石斑鱼和鞍带石斑鱼的杂交以及棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼的杂交线粒体CO I基因严格遵循母性遗传的规律。

综上所述,在斜带石斑鱼和鞍带石斑鱼的杂交以及棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼的杂交中,没有检测到线粒体DNA的父性遗传,线粒体DNA在CO I基因全序列上严格遵循母性遗传规律,至于在杂交子一代的早期发育阶段或者在线粒体DNA其他序列上是否存在线粒体DNA父性遗传现象,还有待于更广泛深入的研究。

参考文献:

- [1] HEEMSTRA P C, RANDALL J E. Groupers of the world [J]. FAO Fisheries Synopsis, 1993, 16(125): 130–132.
- [2] SADOVY Y, CORNISH A S. Reef Fishes of Hong Kong [M]. Hong Kong: Hong Kong University Press, 2000.
- [3] 张海发, 王云新, 刘付永忠, 等. 鞍带石斑鱼人工繁育及胚胎发育研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 36–40.
- [4] 龚孟忠, 陈慧, 范希军. 龙胆石斑鱼引种及人工育苗技术的初步研究[J]. 福建水产, 2004, 3(1): 47–50.
- [5] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [6] 董丽娜, 黄梓荣, 艾红, 等. 北部湾3种金线鱼属鱼类 *CO I* 基因序列的比较分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 508–514.
- [7] 付景, 张迎春. 27种瓢虫 mtDNA-*CO I* 基因序列分析及系统发育研究(鞘翅目: 瓢虫科) [J]. 昆虫分类学报, 2006, 28(3): 179–186.
- [8] SCHWARTZ M, VISSING J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA [J]. New Engl J Med, 2002, 347(8): 576–580.
- [9] KRAYTSBERG Y, SCHWARTZ M, BROWN T A, et al. Recombination of human mitochondrial DNA [J]. Science, 2004, 304(5673): 981.
- [10] SHITARA H, HAYASHI J I, TAKAHAMA S, et al. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage [J]. Genetics, 1998, 148(2): 851.
- [11] ZHAO X, LI N, GUO W, et al. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*) [J]. Heredity, 2004, 93(4): 399–403.
- [12] KVIST L, MARTENS J, NAZARENKO A A, et al. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*) [J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(2): 243.
- [13] KONDO R, MATSUURA E T, CHIGUSA S I. Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method [J]. Genet Res, 1992, 59(02): 81–84.
- [14] MEUSEL M S, MORITZ R F A. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs [J]. Curr Genet, 1993, 24(6): 539–543.
- [15] LLANSMAN R A, AVISE J C, HUETTEL M D. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA [J]. P Natl Acad Sci Usa, 1983, 80(7): 1969.
- [16] DALZIEL A C, STEWART D T. Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae) [J]. Genome, 2002, 45(2): 348–355.
- [17] PASSAMONTI M, SCALI V. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia) [J]. Curr Genet, 2001, 39(2): 117–124.
- [18] HOARAU G, HOLLA S, LESCASSE R, et al. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus* [J]. Mol Biol Evol, 2002, 19(12): 2261.
- [19] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876.
- [20] TAMURA K, DDULEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596.
- [21] KIMURA M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences [J]. P Natl Acad Sci Usa, 1981, 78(1): 454.
- [22] KANEDA H, HAYASHI J, TAKAHAMA S, et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis [J]. P Natl Acad Sci Usa, 1995, 92(10): 4542.
- [23] 郭新红. 不同倍性鱼类 mtDNA 及三倍体湘云鲫 *Sox* 基因研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2004.
- [24] 徐晖, 肖志忠, 孔晓瑜, 等. 褐牙鲈(♀)、夏鲈(♂)及其杂交子一代线粒体 16S rDNA 序列遗传特性的初步研究[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(5): 4.
- [25] BROWN W M, PRAGER E M, WANG A, et al. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution [J]. J Mol Evol, 1982, 18(4): 225–239.
- [26] 毕相东, 杨雷, 侯俊利, 等. *CO I* 基因在海洋动物分子系统学研究中的应用[J]. 水产科学, 2008, 27(2): 4.
- [27] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences

- among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003, 270 (Suppl 1): 96 – 99.
- [28] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847.
- [29] 袁长春, 黎培新, 王燕芳, 等. 用核糖体 ITS 区序列验证自然杂交种 *Meconopsis × cookei* G. Taylor [J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 901 – 907.

Analysis of Genetic Variability of mtDNA *CO I* Genes between two grouper hybrids and their parents

ZHOU Han-lin¹, YANG Sen¹, GAO Chuan¹, ZHANG Lei², ZHANG Hai-fa², LI Shui-sheng¹

ZHANG Yong¹, MENG Zi-ning¹, LIU Xiao-chun¹, LIN Hao-ran^{1 3}

(1. College of Life Sciences/Institute of Aquatic Economic Animals, Sun Yat – Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Daya Bay Fisheries Development Center, Huizhou 516081, China;

3. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China.

Abstract: In order to identify the phylogenetic relationship among two grouper hybrids (Qinglong grouper and Hulong grouper) and their parents (*Epinephelus coioides* ♀, *Epinephelus coioides* ♀ and *E. lanceolatus* ♂), their mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*CO I*) gene fragments were amplified by PCR, and the 1551 base-pair nucleotide sequences of *CO I* were examined. The results show that all 15 sequences are grouped into 9 haplotypes and 249 nucleotide polymorphic loci in *CO I* gene fragments. Sequence divergences and genetic distance analysis showed all the groupers shared 88.1% to 100% similarities in nucleotide sequence, indicating there is no significant genetic difference among these groupers. The two *CO I* haplotypes of Hulong grouper showed 99% and 100% similarities with the haplotype of the female parent *E. fuscoguttatus*, respectively, but only 88.1% similarity with the male parent *E. lanceolatus*. The two *CO I* haplotypes in Qinglong grouper had similarities of 99.7% to 100% with the three haplotypes of the female parent *E. coioides*, and only of 89.3% and 89.4% with the male parent *E. lanceolatus*. The results indicated that the two grouper hybrids were inherited from their maternal parent in mitochondrial *CO I* genes.

Key words: *Epinephelus coioides*; *E. lanceolatus*; Qinglong grouper; Hulong grouper; *CO I*; genetic variability