

文章编号: 1674-5566(2009)04-0398-05

银鲳 3 个野生群体线粒体 CO I 基因的序列差异分析

彭士明¹, 施兆鸿¹, 侯俊利¹, 张浩², 赵峰¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 利用 PCR 技术扩增我国 3 个不同海域 (渤海湾、东海的舟山海域、南海的广东沿海) 银鲳 (*Pampus argenteus*) 线粒体 COI 的基因片段, 得到长度为 604 bp 的片段, 比较分析了 3 个不同地区 48 尾银鲳线粒体 COI 基因序列的变异和遗传结构。结果显示, 48 条序列共检测出多态性位点 30 个, 其中简约信息位点 6 个, 各群体内的多态性位点分别为渤海 8 个、舟山 26 个、广东 1 个; 48 个个体具有 18 个单倍型, 单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.662 2 和 0.002 8。AMOVA 分析结果表明, 群体间的遗传变异占总遗传变异的 -1.03%, 而 101.03% 的遗传变异源于群体内, 3 群体总的遗传分化指数 (F_{ST}) 为 -0.010 3 ($P > 0.05$)。此外, 研究结果还显示, 群体间遗传分化指数与遗传距离均非常低。分析得出: 基于银鲳线粒体 COI 基因的序列分析, 单倍型多样性以东海群体最高 (0.800 9)、渤海群体其次 (0.700 0)、南海群体最低 (0.200 0), 而 3 群体核苷酸多样性则均较低 (< 0.005); 分子变异分析未检测出我国 3 个野生银鲳群体间存在遗传分化现象。

关键词: 银鲳; 遗传多样性; 线粒体 DNA; COI 基因

中图分类号: Q 349; S 917 **文献标识码:** A

Genetic diversity of three wild silver pomfret (*Pampus argenteus*) populations based on CO I gene sequences

PENG Shiming¹, SHI Zhao-hong¹, HOU Jun-li¹, ZHANG Hao², ZHAO Feng¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Shanghai 200090, China;

2. College of Life Science East China Normal University Shanghai 200062, China)

Abstract: The partial mitochondrial COI sequences of 48 silver pomfret (*Pampus argenteus*) from three areas [Bohai Sea (B), East China Sea of Zhoushan (E), South China Sea of Guangdong (S)] were amplified by PCR technique to analyze their sequence variation and genetic diversity. 604 bp COI gene fragments were obtained. A total of 30 polymorphic sites were detected, including 6 parsimony-informative sites. The number of polymorphic sites was 8 for the population B, 26 for the population E and 1 for the population S, respectively. There were 18 haplotypes in 48 COI gene sequences. The average haplotype diversity and nucleotide diversity of the three populations were 0.662 2 and 0.002 8, respectively. Analysis of AMOVA indicated that large COI gene differentiation (101.03%) occurred within populations and -1.03% occurred among

收稿日期: 2009-01-04

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (东 2008M14, 东 2007Z02); 沪农科攻字 (2007) 第 4-1 号

作者简介: 彭士明 (1980-), 男, 山东东营人, 博士, 研究方向为鱼类繁殖生物学与遗传育种。E-mail: shimingpeng@163.com

通讯作者: 施兆鸿, E-mail: shizh@sh163.net

populations. The total genetic differentiation index (F_{ST}) of the three populations was -0.0103 ($P > 0.05$). Additionally, both the F_{ST} and $k^{-2}p$ distances within populations were very low. The present results suggested that the highest haplotype diversity was in population E (0.8009), the middle was in population B (0.7000) and the lowest was in population S (0.2000). The nucleotide diversities in three populations were very low (< 0.005). There was no genetic differentiation in different wild stocks of silver pomfret based on mitochondrial DNA COI gene sequences.

Key words: *Pampus argenteus*; genetic diversity; mitochondrial DNA; COI gene

银鲳 (*Pampus argenteus*) 作为我国主要的海产经济鱼类之一, 广泛分布于我国沿海地区, 北起渤海南至南海均有银鲳分布。由于银鲳具有较高的经济食用价值, 近些年来的过度捕捞致使世界范围内银鲳资源明显减少^[1]。因此, 出于满足银鲳的巨大市场需求及其资源恢复的目的, 近些年来具有银鲳资源的国家 (如中国、科威特等) 均开始了针对银鲳人工育苗与养殖的项目攻关, 并均取得了较好的研究成果^[2-6]。然而, 截至目前, 尚未见有关银鲳遗传背景方面的研究报道。而研究分析银鲳的遗传背景, 评估其遗传多样性现状, 对于银鲳的品种选育和遗传改良、遗传多样性保护及可持续利用等均具有重要的理论和应用价值。由于 COI 基因进化速度较快, 可适合于种群水平遗传多样性的检测, 也可用于种间分析。因此, 本研究采用线粒体 DNA COI 基因对我国北部、东部和南部海域 3 个银鲳群体的遗传多样性进行了研究分析, 以期为我国银鲳资源的合理开发利用提供科学的参考依据, 并为未来我国银鲳的遗传育种与良种选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品收集

分别从渤海湾 (B)、东海的舟山群岛 (E)、南海广东 (S) 附近海域各采集银鲳标本 16、22、10 尾。渤海湾、舟山群岛、南海广东银鲳标本的平均叉长分别为 14.2 cm、15.8 cm、16.5 cm, 平均体重分别为 97.5 g、113.3 g、120.1 g。分别取背部肌肉组织, 置于 95% 乙醇中保存, 存放于 -20°C 中保存待用。

1.2 DNA 的提取、扩增及测序

分别银鲳样品中取 0.1 g 肌肉用于提取总 DNA。总 DNA 的提取采用常规的酚氯仿方法^[7], DNA 经沉淀、洗涤并干燥后, 溶于 50 μL TE 缓冲液中, 于 -20°C 中保存备用。

扩增所用引物为, COI_a: 5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3', COI_b: 5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3' 每个 PCR 反应总体积为 50 μL 其中 29.6 μL 超纯水、5 μL 10 \times PCR 缓冲液、2 μL 10 mmol/L dNTPs、5 μL 25 mmol/L MgCl₂、4 μL 10 mmol/L 引物 (各 2 μL)、0.4 μL Taq DNA 聚合酶、4 μL 模板 DNA。在 GeneAmp PCR 仪 (9700) 上进行 PCR 反应, 反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环 (94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min), 72°C 延伸 10 min, 10°C 保温。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统观察。

PCR 产物经纯化后, 在全自动基因测序分析仪 CEQ8000 (Beckman Coulter US) 上进行测序, 测序所用引物为扩增引物。

1.3 序列分析

利用 ClustalX^[8] 程序对 DNA 序列进行多重对位排列并辅以手工校正。用 MEGA 4.0 软件^[9] 分析不同序列间的碱基组成、变异位点、简约信息位点等, 并计算群体间的遗传距离。用 DNASP4.0^[10] 计算单倍型多态性和核苷酸多样性等遗传多样性指数。使用 Arlequin 3.0^[11] 进行分子变异等级分析 (AMOVA 分析)。

2 结果

2.1 不同群体 COI 基因序列特征及其单倍型分布

本研究对银鲳 3 群体 48 个样本线粒体 COI 基因进行了序列测定, 通过比对并经过人工校正后获得 604 bp 的片段用于分析。48 个样本共检测到多态位点 30 个, 其中简约信息位点 6 个, 转换位点 16 个, 颠换位点 10 个, 转换与颠换同时存在的位点 4 个。银鲳 3 群体平均的核苷酸碱基组成为 C = 21.33%、T = 33.94%、A = 25.87%、G = 18.86%。

银鲳 3 群体 48 个样本共计获得 18 个单倍型, 其中 3 群体共享单倍型只有 1 个 (单倍型 1) (见表 1)。渤海群体 (B) 具有 5 个特有单倍型, 东海舟山群体 (E) 具有 9 个特有单倍型, 广东群体 (S) 10 个样本共有 2 个单倍型, 其中 1 个 (单倍型 18) 为其特有单倍型 (表 1)。

表 1 18 个单倍型在银鲳群体中的分布
Tab. 1 The distribution of 18 haplotypes in silver pomfret populations

群体	单倍型																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
B	9	1	1	1	1	1	1	1										
E	10				1	1			1	1	1	1	1	1	1	2	1	
S	9																	1

2.2 不同群体遗传多样性及其遗传分化

银鲳 3 群体遗传多样性的分析结果显示, 群体 B、E 具有较高的单倍型多样性, 分别为 0.700 0、0.800 9, 而群体 S 的单倍型多样性较低, 为 0.200 0。3 群体核苷酸多样性与平均核苷酸差异数均比较低 (表 2)。分子变异等级分析 (AMOVA) 结果显示, 群体内存在很高的遗传变异 (101.03%), 而群体间遗传分化非常小 ($F_{ST} = -0.010 32$, $P > 0.05$, 表 3)。此外, 由群体间的遗传分化指数与遗传距离同样可以看出 3 群体间的遗传距离 (均小于 0.005) 与遗传分化指数 (F_{ST} 为负值) 均非常小 (表 4)。由此表明, 根据线粒体 COI 基因的序列分析, 银鲳 3 群体间并无明显的遗传分化现象。

表 2 银鲳 3 群体的遗传多样性指数
Tab. 2 The genetic diversity of three silver pomfret populations

群体	样本数	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异数
B	16	0.700 0 ± 0.127 4	0.002 0 ± 0.001 5	1.216 7 ± 0.816 6
E	22	0.800 9 ± 0.087 9	0.004 5 ± 0.002 7	2.688 3 ± 1.486 5
S	10	0.200 0 ± 0.154 1	0.000 3 ± 0.000 5	0.200 0 ± 0.269 1
总计	48	0.662 2 ± 0.079 6	0.002 8 ± 0.001 9	1.688 8 ± 1.006 7

表 3 银鲳群体分子变异分析结果
Tab. 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the silver pomfret populations

遗传差异来源	自由度	遗传变异元素	占总变异百分比
群体间	2	-0.008 68 V_a	-1.03
群体内	45	0.850 05 V_b	101.03
总计	47	0.841 37	100

注: $F_{ST} = -0.010 32$, $P > 0.05$

表 4 银鲳 3 群体间的遗传分化指数 F_{ST} (左下角) 及遗传距离 (右上角)
Tab. 4 Genetic differentiation index F_{ST} (below diagonal) and genetic distance (above diagonal)

	B	E	S
B		0.003	0.001
E	-0.001 12		0.002
S	-0.003 83	-0.026 78	

3 讨论

线粒体基因由于其进化速率快,呈母系遗传,种群之间的遗传差异易于被检出,被认为是评估群体遗传变异以及区别不同自然种群之间有效的遗传标记,并已在许多物种得到应用。mDNA 基因组内不同的区域进化速度存在差异,适合不同水平的进化研究。已有研究证实,脊椎动物线粒体蛋白编码基因中 ND4、ND5、Cytb 和 COI 含有良好的系统发育信息^[12]。由于 COI 基因进化速度较快,适合于种群水平差异的检测,也可用于种间分析。目前,细胞色素氧化酶基因 (COI/COII) 作为鱼类遗传标记的研究则较少,国内主要在鲤科^[13-14],鲷科^[15]等鱼类上有相关报道。国外研究学者目前已将线粒体 COI 基因作为一种基于 DNA 水平的鱼类品种鉴定工具,如某些鳕属鱼类^[16]、鲭科鱼类^[17]。本研究运用线粒体 COI 基因分析了我国北部、中部、南部海域银鲳群体的遗传多样性,研究结果可在一定程度上揭示我国银鲳资源当前的遗传背景。结果显示,利用 COI 基因可以检测到银鲳群体较多的多态位点与单倍型类型,但 3 群体的核苷酸多样性均较低,遗传多样性以东海与渤海群体较高、广东群体较低,表明 COI 基因可以作为检测银鲳群体遗传结构的一种分子标记。我们用相同的样本材料以 D-loop 基因为分子标记所得出的结果表明,各群体同样具有较高的单倍型多样性与较低的核苷酸多样性,这在一定程度上支持了利用 COI 基因所得出的研究结果,同时也肯定了线粒体 COI 分子标记作为检测银鲳群体遗传多样性的有效性。研究结果还显示,尽管在 3 群体 48 个样本中共检测出 18 种单倍型,其中共享单倍型一个(单倍型 1),但是,单倍型 1 则是 3 群体中各自的主要单倍型类型,其在群体 B、E、S 中的出现频率分别为 56.25%、45.45%、90%。由此可以初步得出,基于 COI 基因分子标记分析,银鲳 3 群体间遗传差异较小。

研究结果显示,银鲳群体 B、E 具有较高的单倍型多样性,但群体 S 的单倍型多样性较低,原因可能在于群体 S 的样本量较小。已有的资料表明,庞大的种群数量、环境的不均一性以及适于种群快速增长的生活习性是维持自然种群内较高单倍型多样性的基础^[18]。对于银鲳种群,我国沿海自北到南均有分布,较大的种群数量可能是其维持较高遗传多样性的原因。研究结果还显示,银鲳群体其核苷酸多样性较低。Grant 与 Bowen^[19]通过对海水鱼类线粒体 DNA 序列的遗传变异分析,将海水鱼类根据不同单倍型多样性与核苷酸多样性间的组合分成了 4 种类型:第一种类型是较低的单倍型多样性 (<0.5) 与较低的核苷酸多样性 (<0.005)、第二种类型是高的单倍型多样性与低的核苷酸多样性、第三种类型是低的单倍型多样性与高的核苷酸多样性、第四种类型是高的单倍型多样性与高的核苷酸多样性。本试验的结果(除群体 S 外)属于第二种类型。对于海水鱼类,庞大的种群数量往往是其维持较高遗传多样性的主要基础之一^[20]。因此,银鲳群体之所以具有较高的单倍型多样性,原因可能在于目前我国的银鲳资源相对较为丰富,而较低的核苷酸多样性则是由于银鲳群体各单倍型之间序列差异较小。此外,已有的研究表明,鲸鲨 (*Rhincodon typus*) ($h=0.90$, $\pi=0.005$)^[21]、尖吻鲭鲨 (*Isurus oxyrinchus*) ($h=0.76$, $\pi=0.0035$)、西北太平洋毛鳞鱼 (*Mallotus villosus*)、红拟石首鱼 (*Sciaenops ocellata*) 与西大西洋小沙丁鱼 (*Sardinella aurita*) ($h=0.79\sim0.98$, $\pi=0.0029\sim0.0068$) 均属于上述的第二种类型^[19]。

分子变异等级分析 (AMOVA) 的结果显示,遗传变异基本来源于群体内,而群体间的遗传变异非常小,这表明,基于线粒体 COI 基因的序列分析,银鲳 3 群体间并无明显的遗传分化现象。群体间较小的遗传分化指数 (F_{ST}) 与遗传距离同样证明了银鲳 3 群体间没有明显的遗传分化。由于银鲳属于洄游性海水鱼类,长距离的洄游特性可能是导致其各群体间无明显遗传分化的原因之一。当然,从一个基因评估银鲳不同群体的遗传多样性差异和确定遗传标记远远不够,必须结合其它基因标记,如 Cyt b 基因、D-loop 序列以及核基因序列等,进行综合分析以得到更多的序列信息,最终获得更全面、客观的结论。因此,当前应结合运用多种分子标记方法,弄清我国范围内银鲳资源的遗传背景,对于今后更加合理地开发利用我国的银鲳资源,使其达到可持续利用的目的具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] Wen T Y, Jian L, Gen H Y. Multiplex genotyping of novel microsatellites from silver pomfret (*Pampus argenteus*) and cross-amplification in other pomfret species [J]. *Molecular Ecology Notes* 2006, 6: 1073—1075.
- [2] Amatar S M, Lone K P, Abulrezaq T S, et al. Spawning frequency, fecundity, egg weight and spawning type of silver pomfret *Pampus argenteus* (Euphrasen) (Serranidae), in Kuwait waters [J]. *Journal of Applied Ichthyology* 2004, 20(3): 176—188.
- [3] Dadzie S, Abouls F, Allq E. The food and feeding habits of the silver pomfret *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait waters [J]. *Journal of Applied Ichthyology* 2000, 16(2): 61—67.
- [4] 施兆鸿, 王建钢, 高露姣, 等. 银鲳繁殖生物学及人工繁育技术的研究进展 [J]. *海洋渔业*, 2005, 27(3): 246—250.
- [5] 施兆鸿, 高露姣, 谢营梁, 等. 舟山渔场银鲳和灰鲳繁殖特性的比较 [J]. *水产学报*, 2006, 30(5): 647—652.
- [6] 施兆鸿, 马凌波, 高露姣, 等. 人工育苗条件下银鲳仔稚幼鱼摄食与生长特性 [J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(4): 38—46.
- [7] Sambrook J, Fritsch E P, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratories 1989.
- [8] Thompson JD, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustalw windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research* 1997, 25: 4876—4882.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution* 2007, 24: 1596—1599.
- [10] Rozas J, Sanchez-Delbarrio C J, Messeguer X, et al. DnaSP: DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics* 2003, 19: 2496—2497.
- [11] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005, 1: 47—50.
- [12] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. *Molecular Biology and Evolution* 1996, 13(7): 933—942.
- [13] 王成辉, 李思发. 中国红鲤线粒体 COII 基因的遗传变异和亲缘关系 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(11): 1226—1231.
- [14] 凌去非, 李思发. 鲤科 25 种鱼类线粒体 COII 基因序列差异及其系统进化关系 [J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 747—752.
- [15] 张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 两种鲷属鱼类线粒体 COI 基因片段序列的比较 [J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(4): 403—408.
- [16] Spies I B, Gaichas S, Stevenson D E, et al. DNA-based identification of Alaska skates (*Amblyraja*, *Bathyraja* and *Raja*; Rajidae) using cytochrome oxidase subunit I (coI) variation [J]. *Journal of Fish Biology* 2006, 69 (Supplement B): 283—292.
- [17] Paine M A, McDowell J R, Graves J E. Specific identification using COI sequence analysis of scambroid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island [J]. *Ichthyol Res* 2008, 55: 7—16.
- [18] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics* [M]. New York: Columbia University Press 1987.
- [19] Grant W S, Bowen B W. Population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *J Heredity* 1998, 89: 415—426.
- [20] Avise J. *Phylogeography* [M]. Cambridge MA: Harvard University Press 1998.
- [21] Ramirez-Macias D, Vazquez-Juarez R, Galvan-Magana F, et al. Variations of the mitochondrial control region sequence in whale sharks (*Rhinodon typus*) from the Gulf of California, Mexico [J]. *Fisheries Research* 2007, 84: 87—95.