

基于 COI 序列比较中国和科威特养殖鲳鱼群体的遗传差异

孙 鹏

(中国水产科学研究院 东海水产研究所 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090)

摘要: 为探讨中国和科威特鲳鱼(*Pampus*)养殖群体的遗传差异和遗传多样性, 本研究对两个鲳鱼群体线粒体细胞色素 c 氧化酶 I 亚基(COI)部分序列进行了比较和分析。通过 PCR 扩增和测序, 共获得 COI 基因片段 47 条, 定义了 8 个单倍型。两个群体的 COI 序列的 A+T 含量均高于 G+C 含量, 在中国养殖群体中检测到 4 个变异位点, 在科威特群体中检测到 14 个。两个群体的单倍型多样性水平较高(0.566~0.643), 但核苷酸多样性水平均较低(0.0022~0.0030)。NJ 系统发生树和遗传距离分析结果表明中国和科威特养殖群体的遗传差异较大, 高于种内差异水平, 因此两个养殖群体并非同一种鲳属鱼类。

关键词: 鲳鱼(*Pampus*); 遗传多样性; 线粒体 DNA; COI

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)01-0053-06

doi: 10.11759/hyxx20131205003

鲳属(*Pampus*)鱼类隶属于鲈形目(Perciformes), 鲳科(Stromateidae), 广泛地分布于中国沿海、印度洋和太平洋沿岸, 由于其具有很高的营养价值和经济价值, 深受消费者喜爱, 是中国沿海重要的经济鱼类^[1]。过去, 中国分类学家将中国海区的鲳属鱼类分成 3 种, 即银鲳(*P. argenteus*)、灰鲳(*P. cinereus*)和中国鲳(*P. chinensis*)^[2-3]。而柳卫海^[4]、许玉甫^[5]建议将中国的鲳属鱼类分为 5 种, 即银鲳、灰鲳、中国鲳、翎鲳(*P. punctatissimus*)和珍鲳(*P. minor*)。多年来, 由于过度捕捞和环境污染, 其自然资源量锐减, 因此开展人工增养殖成为恢复资源的重要途径。近年来, 国内外水产工作者相继开展起鲳属鱼类人工繁育相关研究, 其中科威特和中国先后在繁育工作中获得较多进展^[6-10]。

21 世纪初, 施兆鸿^[6-8]开始开展银鲳人工育苗, 并取得了一些进展。期间, 国内也在其繁育生物学^[7-8]、营养学^[11]等方面积累了一定的经验。同时, 国内在银鲳种群遗传结构和遗传多样性方面也进行了一些研究。例如, 孟彦羽等^[12]采用随机扩增多态性分析(RAPD)研究了海南、浙江、江苏和河北近海海区的银鲳群体; 彭士明等^[13]对中国渤海、东海和南海区 3 个野生银鲳群体开展研究; 彭士明等^[14]还对养殖和野生银鲳 2 个群体的遗传多样性进行了比较。但是, 总体上银鲳种群遗传学研究较少, 而涉及养殖群体方面的研究更少。

目前, 鲳鱼人工养殖至今尚未形成规模, 有关种群遗传多样性方面的研究对其人工繁育、遗传育种和资源保护均有重要的指导作用。此外, 在养殖实践中发现, 中国养殖鲳鱼和科威特养殖品种虽然均被称为“银鲳”, 但是其形态学差异较大。同样, 李渊等^[15]对科威特、巴基斯坦、北部湾和中国台湾近海的银鲳开展了研究。由于未能采集到台湾以北海域的银鲳, 推测银鲳主要分布于台湾海峡以南, 应属于暖水性鱼类; 而 Nakabo^[16]也曾明确指出银鲳只分布于台湾海峡以南。考虑到东海水产研究所养殖的银鲳捕捉于东海区的浙江玉环和六横等海域, 与以上研究结论不一致。因此, 摸清中国养殖鲳鱼的物种分类地位也势在必行。

线粒体基因(mtDNA)具有结构简单、母系遗传、将进化速率快、几乎不发生重组等特点, 已成为目前研究种群遗传结构和种群亲缘关系的有效工具之一^[17-18]。其中, 细胞色素 C 氧化酶亚基 (cytochrome c oxidase subunit, COI)序列进化速度较快, 是鉴别鱼种最有效的 DNA 条形码之一; 其不仅适合于种群水平遗传多样性的检测, 也可用于种间分析。目前, 已被广泛地应用于物种的分子系统学

收稿日期: 2013-12-05; 修回日期: 2014-08-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41306170); 上海市自然科学基金资助项目(12ZR1455000)

作者简介: 孙鹏(1980-), 博士, 山东省枣庄市人, 副研究员, 主要从事海洋鱼类繁殖与遗传学研究, E-mail: sunpeng1128@163.com

和种群遗传学研究中。例如,冯建彬等^[19]利用 COI 序列对中国五大淡水湖日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)群体进行分析;彭士明等^[14]利用 COI 基因序列比较了养殖银鲳与野生银鲳群体的遗传差异。因此,本研究采用线粒体 COI 基因序列比较分析了中国人工养殖的鲳鱼群体和科威特所养殖群体的遗传差异,探讨两个群体的分类地位、遗传变异水平和遗传多样性,为今后的遗传育种和资源保护提供信息支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用样品共 47 尾,均为人工养殖鲳鱼个体。其中,26 尾来自东海水产研究所养殖群体,21 尾来自科威特养殖群体。取背部肌肉组织保存于 95% 乙醇中待 DNA 提取用。

1.2 总 DNA 提取、COI 基因片段扩增与测序

取保存的样品肌肉 100 mg,通过常规的酚-氯仿法提取基因组 DNA^[20],并于-20℃下保存备用。基因扩增采用通用引物 COI a: AGT ATA AGC GTC TGG GTA GTC 和 COI f: CCT GCA GGA GGA GGA GAY CC^[21]。PCR 总反应体积为 50 μL,反应体系包含:10×PCR buffer 5.0 μL, Mg²⁺终浓度为 2.0 mmol/L, 两条引物(10 μmol/L)各 2 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μL, Taq 酶(TaKaRa, 5 U/μL)0.4 μL, 模板 2.0 μL, 并以 ddH₂O 补足体系。反应程序为:94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s; 52℃退火 30 s; 72℃延伸 45 s, 共 30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。

PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海华舜)纯化,送至上海生工生物技术有限公司进行序列测定,测序仪为 ABI 3730 基因分析仪。

1.3 数据分析

测序所得序列采用 Clustal X 1.81^[22]软件进行比对,并辅以人工校对。利用 DNASP 4.0^[23]计算其单倍型多样性(haplotype diversity, h)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, Pi)和简约信息位点(parsimony informative sites)数。通过 MEGA4.0^[24]软件分析不同序列的碱基组成、变异位点和核苷酸差异等,计算个体间的遗传距离,采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)基于 Kimura 双参数模型构建单倍型系统

树,以中国鲳(*P. chinensis*)、珍鲳(*P. minor*)和小眼岩头长颌鱼(*Petrocephalus microphthalmus*)(Genbank 号分别为: JF790260、JF790274.1 和 AP009609.1)作为外群,进化树中节点的自举置信度水平由自引导值(Bootstrap value)估计,重复次数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 两个群体 COI 基因片段的序列特征

通过 PCR 扩增、测序和人工校对,共获得两个群体 COI 基因片段 47 条,其碱基长度为 629 bp。在中国和科威特养殖群体中, A+T 含量分别为 59.6% 和 61.3%,均高于其 G+C 含量(表 1)。

表 1 中国和科威特养殖鲳鱼群体的碱基组成
Tab. 1 Base pair composition in pomfret from Chinese and Kuwait cultured populations

养殖鲳鱼 群体	碱基组成(%)					
	A	T	G	C	A+T	G+C
中国群体	25.7	33.9	18.6	21.8	59.6	40.4
科威特群体	26.1	35.2	17	21.7	61.3	38.7
平均	25.9	34.55	17.8	21.75	60.45	39.55

47 条 COI 序列共定义了 8 个单倍型,包括中国群体单倍型 3 个和科威特群体单倍型 5 个(序列号: JF790277、EU119292、EU119289、JN202065、JN202066、JN202103~JN202105),两个群体的单倍型没有发现重叠。在中国群体中,共检测到变异位点 4 个,发生 4 次点突变,其中简约信息位点(Parsimony informative sites)4 个,无单变异位点(Singleton variable sites),无插入和缺失现象;在科威特群体中,检测到变异位点 14 个,发生 14 次突变,其中简约信息位点 3 个,单变异位点 11 个,无插入和缺失现象。

2.2 两个群体的遗传结构和遗传多样性

2 个群体的遗传距离如表 2 所示,中国养殖群体内的遗传距离为 0.001~0.005,科威特养殖群体的遗传距离为 0.001~0.014,因此,群体内均未达到物种分化程度。而两个群体之间的遗传距离较大,为 0.109~0.116,表明两个群体存在种间差异。

中国和科威特群体的单倍型多样性水平均较高,分别为 0.566 和 0.643(表 3),但核苷酸多样性水平较低,仅为 0.0022 和 0.0030,且科威特群体的遗传多样性水平稍高于中国群体。

表 2 两个养殖鲷鱼群体的单倍型遗传距离

Tab. 2 Genetic distance of haplotypes in pomfret from two cultured populations

	CN1	CN2	CN3	KW1	KW2	KW3	KW4	KW5
CN1								
CN2	0.001							
CN3	0.003	0.005						
KW1	0.110	0.112	0.110					
KW2	0.116	0.118	0.116	0.012				
KW3	0.109	0.110	0.109	0.001	0.013			
KW4	0.114	0.115	0.113	0.002	0.014	0.003		
KW5	0.109	0.110	0.109	0.001	0.013	0.002	0.003	

注: CN 代表中国群体, KW 代表科威特群体

表 3 基于 COI 序列的中国和科威特养殖鲷鱼群体单倍型多样性和核苷酸多样性

Tab. 3 Haplotype diversity and nucleotide diversity of pomfret population cultured in Chinese and Kuwait

养殖鲷鱼群体	样品量	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均碱基差异
中国群体	26	3	0.566(0.083)	0.0022(0.0004)	1.378
科威特群体	21	5	0.643(0.097)	0.0030(0.0013)	1.886

注: 括号中的数值为标准差

利用 COI 序列片段基于双参数模型构建的系统发生 NJ 树如图 1 所示。中国和科威特养殖群体的单倍型分别聚在不同的分支上, 且两个群体遗传差异较大。NJ 树以中国鲷、珍鲷和小眼岩头长颌鱼作为外群(outgroup), 科威特群体首先与鲷属鱼类中的中国鲷和珍鲷聚在一起, 然后与中国养殖群体聚集, 最后再与其它属中的鱼类聚集在一起。可见, 科威特鲷鱼群体与中国鲷和珍鲷的亲缘关系更接近, 而与中国养殖群体关系较远。

3 讨论与结论

3.1 两个鲷鱼群体遗传多样性

鲷属鱼类是中国重要的海产鱼类, 由于近年来

的过度捕捞和环境污染, 中国多个海区的鲷鱼渔业资源都呈现衰减的趋势, 不但鱼类种群的数量急剧下降, 而且渔业资源结构也发生改变, 出现低龄化、小型化^[4-5, 25]。本研究通过线粒体 COI 基因序列比较了中国和科威特鲷鱼养殖群体的遗传差异。在两个养殖群体中, 单倍型多样性水平较高, 但是核苷酸多样性水平较低。彭士明等^[13]对中国渤海、东海和南海区 3 个野生银鲷群体的研究认为, 东海和渤海银鲷群体的遗传多样性较高, 而南海区遗传多样性水平较低; 而对养殖和野生银鲷 2 个群体的遗传多样性进行的比较研究发现, 养殖群体遗传多样性低于野生群体^[14]。这也与本研究结果相一致。

核苷酸多样性表示每个群体内各单倍型的两两

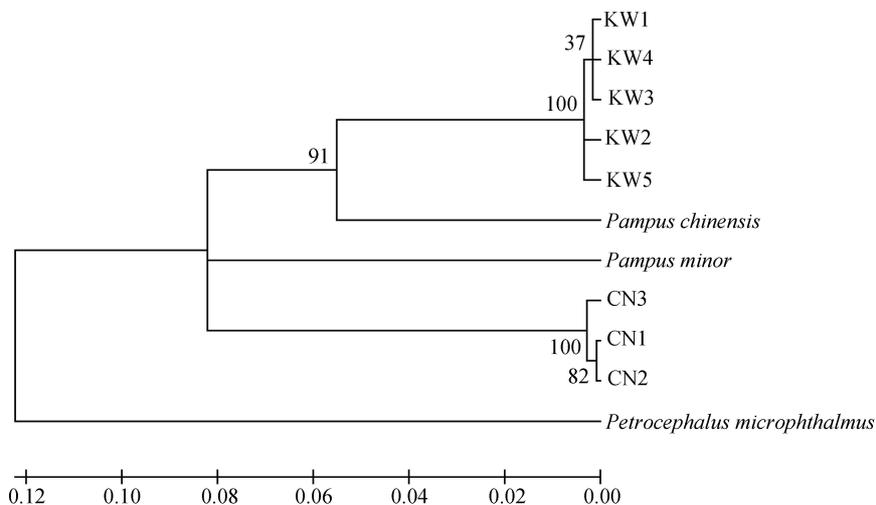


图 1 基于 COI 单倍型的养殖鲷鱼群体 NJ 系统发生树

Fig.1 NJ phylogenetic tree of two pomfret populations based on COI haplotypes

配对差异的平均值, 是一个重要的群体遗传多样性指标。一般来说, 物种遗传多样性高低与其对环境的适应能力、生存能力和进化潜力有关, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件。遗传多样性的降低或者丧失将会降低物种对外界环境的适应能力^[26-27]。因此, 建议在人工繁育时应适当增加野生群体, 选择尽可能多的亲本或者遗传多样性相对较高的亲本, 以防止近交衰退和遗传多样性的进一步丧失。

3.2 鲳属鱼类分类学

作为重要的经济型鱼类, 鲳属鱼类在印度洋和太平洋地区均有分布。因为其形态学相似性高, 在分类上存在较大的难度。日本学者认为鲳属鱼类应该被分成 3 种, 即银鲳、镰鲳(*P. echinogaster*)和中国鲳^[28-30]; 中国学者则将其分成另外 3 种, 即银鲳、灰鲳(*P. cinereus*)和中国鲳^[31]; 近年来, 刘静等建议将中国的鲳属鱼类分成 5 种, 即银鲳、中国鲳、灰鲳、珍鲳和翎鲳^[32-33]。作者在近年来研究中发现, 个体差异增加了鲳属鱼类形态学分类的难度, 根据其侧线、鳍条数、和鳃耙形状等分类依据往往难以得到确实的结论。在这些性状中, 脊椎骨数目变化较小, 因此其分类作用较为明显。

基于先前对鲳属鱼类的研究, 作者发现珍鲳个体普遍较小, 其椎骨数为 30, 中国鲳体型(特别是胸鳍和背鳍的位置和鱼体形状)与其他几种差异较大, 因而此两种鲳属鱼类较容易区分; 而其他 3 种的差异较小, 容易混淆。本研究发现, 中国和科威特所称的银鲳养殖群体的遗传距离差异较大, 已经达到了物种分化程度; 系统发生树也显示, 两个群体差异较大, 科威特群体与中国鲳和珍鲳的亲缘关系更近, 作者推断两种养殖“银鲳”并非同一物种。这也与通过其他线粒体分子标记得到的结论相一致^[34]。解剖学观察发现, 两种鲳鱼形态学也具有较大差异, 中国人工养殖银鲳的椎骨数为 41, 而科威特养殖“银鲳”、巴基斯坦、印度、缅甸、泰国等海区的银鲳群体的椎骨数均为 37^[34]。根据 Fishbase 的记载, 银鲳椎骨数为 34~37, 镰鲳的椎骨数为 41; 与其他几种鲳属鱼类的椎骨数差异较大。那么, 科威特养殖群体可能为银鲳, 而中国人工养殖的鲳鱼有待于进一步确定分类地位。这也与李渊等^[15]对中国和科威特银鲳分类的研究结果相一致。

中国人工养殖鲳鱼亲本来源于东海北部, 而刘静等^[35]根据在厦门福建海区新采集的标本, 认为银

鲳椎骨数为 40, 镰鲳的椎骨数为 41; 同时, 镰鲳主要分布于日本海、渤海、黄海和东海, 在台湾海峡以南较少, 而银鲳仅分布于广东以南和东南亚海域^[15-16]; 此外, 是否这些数据能真正作为几种鲳属鱼类的分类标准还有待于进一步验证^[35]。因此, 如果其叙述准确的话, 中国的养殖鲳鱼群体也有可能是镰鲳。总之, 目前的结果仍难以判定两种鲳鱼的具体分类地位。近年来, “银鲳”人工繁育已经在中国开展起来, 而对于物种分类地位的确定也亟待解决。相信随着传统分类学和相关分子生物学数据的不断积累, 两种“银鲳”的分类地位将会得到更清晰的阐述, 而物种的确定也将为今后养殖群体的相关研究提供基础支持。

致谢: 感谢科威特科学院渔业研究所 Dr. Sulaiman Al-matar 和陈卫忠研究员提供科威特银鲳样品。

参考文献:

- [1] 孙鹏, 尹飞, 施兆鸿, 等. 基于 COI 部分序列探讨南海鲳属鱼类系统进化与种群遗传结构[J]. 海洋科学, 2012, 36(6): 15-21.
- [2] 伍汉霖. 鲳科. 福建鱼类志[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1984: 431-433.
- [3] Cui Z X, Liu Y, Liu J, et al. Molecular identification of *Pampus* fishes (Perciformes, Stromateidae)[J]. Ichthyological Research, 2010, 57(1): 32-39.
- [4] 柳卫海, 詹秉义. 东海区鲳鱼资源利用现状分析[J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(1): 30-34.
- [5] 许玉甫, 周军, 张国胜, 等. 河北沿海银鲳渔业资源现状分析[J]. 河北渔业, 2009, 6: 4-7.
- [6] 施兆鸿, 赵峰, 王建钢, 等. 舟山渔场银鲳人工授精及孵化[J]. 渔业现代化, 2009, 36(1): 18-21.
- [7] 施兆鸿, 彭士明, 王建钢, 等. 人工养殖银鲳子代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 267-274.
- [8] 施兆鸿, 马凌波, 高露娇, 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.
- [9] Almatar S M. Spawning frequency, fecundity, egg weight and spawning type of silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen) (Stromateidae), in Kuwait waters[J]. J Appl Ichthyol, 2004, 20 (3): 176-188.

- [10] Azad I S, Al-Marzouk A, James C M, et al. Scuticociliatosis-associated mortalities and histopathology of natural infection in cultured silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) in Kuwait[J]. *Aquaculture*, 2007, 262: 202-210.
- [11] 彭士明, 尹飞, 孙鹏, 等. 不同饲料对银鲳幼鱼增重率、肝脏脂酶及抗氧化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 949-954.
- [12] 孟彦羽, 章龙珍, 赵峰, 等. 银鲳 4 个地理种群遗传多样性的初步研究[J]. *海洋渔业*, 2009, 31(1): 48-52.
- [13] 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利, 等. 银鲳 3 个野生群体线粒体 COI 基因的序列差异分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(4): 398-402.
- [14] 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利. 基于线粒体 D-loop 区与 COI 基因序列比较分析养殖与野生银鲳群体遗传多样性[J]. *水产学报*, 2010, 34(1): 19-25.
- [15] 李渊, 宋娜, Khan F S, 等. 银鲳形态特征与 DNA 条形码研究[J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1601-1608.
- [16] Nakabo T. Fishes of Japan with pictorial keys to the species, second edition [M]. Kanagawa: Tokai University Press, 2002: 961-962, 1580.
- [17] 徐梅英, 李继姬, 郭宝英, 等. 基于线粒体 DNA 12 S rRNA 和 COIII 基因序列研究中国沿海 7 个长蛸 (*Octopus variabilis*) 野生群体的遗传多样性[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(3): 387-396.
- [18] 周超, 郭宝英, 吴常文, 等. 基于线粒体 COIII 基因分析厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 养殖群体遗传多样性[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2): 249-253.
- [19] 冯建彬, 孙悦娜, 程熙, 等. 我国五大淡水湖日本沼虾线粒体 COI 基因部分片段序列比较[J]. *水产学报*, 2008, 32(4): 517-525.
- [20] Sambrook J, Fritsch E P, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 463-470.
- [21] Palumbi S R, Kwasing B. Population biology of the Trans-arctic exchange: MtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins[J]. *Evolution*, 1991, 45: 1790-1805.
- [22] 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 Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [23] Rozas J, Sanche-del Barrio J C, Messenguier X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2496-2497.
- [24] 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: 1596-1597.
- [25] 曾玲, 金显仕, 李富国. 黄海南部银鲳生殖力及其变化[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(6): 1-5.
- [26] Feral J P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 268: 121-145.
- [27] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to conservation genetics[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 423-490.
- [28] Haedrich R L. The stromateoid fishes: systematics and a classification[J]. *Bull Mus Comp Zool*, 1967, 135: 131-139.
- [29] Nakabo T. Fishes of Japan with pictorial keys to the species[M]. Tokyo: Tokai University Press, 1993.
- [30] Yamada U. Fishes of the East China Sea and the Yellow Sea[M]. Nagasaki: Seikai National Fisheries Research Laboratory, 1986.
- [31] 邓思明, 熊国强, 詹鸿禧. 鱼类学论文集(第二辑)[M]. 北京: 科学出版社, 1981, 25-38.
- [32] Liu J, Li C S. A new pomfret species, *Pampus minor* sp. Nov[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 1998, 16: 280-285.
- [33] 刘静, 李春生, 李显森. 中国鲳属鱼类系统发育和动物地理学研究[J]. *海洋科学集刊*, 2002, 44: 235-239.
- [34] Sun P, Yin F, Gao Q X et al. Genetic diversity and population structure of silver pomfret (*Pampus argenteus*) in the Indo-West Pacific revealed by mitochondrial control region sequences[J]. *Biochem System Ecol*, 2013, 51: 28-36.
- [35] Liu J, Li C S, Ning P. Identity of silver pomfret *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788) based on specimens from its type locality, with a neotype designation (Teleostei, Stromateidae)[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2013, 38(1): 171-177.

Comparison of genetic difference in cultured *Pampus* populations between China and Kuwait based on COI partial sequences

SUN Peng

(Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Received: Dec., 5, 2013

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

Abstract: In order to investigate genetic variance and genetic diversity between China and Kuwait cultured populations of silver pomfret, COI partial sequences were compared and analyzed. By PCR amplification and sequencing, 47 sequences were obtained, and 8 haplotypes were defined. The polymorphic sites in China and Kuwait populations were 4 and 14, respectively. The contents of A+T are higher than G+C in each populations, and both populations showed higher levels of haplotype diversity (0.566~0.643) and lower levels of nucleotide diversity (0.0022~0.0030). Results of NJ phylogenetic tree and genetic distance suggest that cultured *pampus* in two countries have significant genetic variance, and should be viewed as two different species.

(本文编辑: 谭雪静)