根据 mtDNA D-loop 序列分析东海银鲳群体遗传多样性

彭士明¹, 施兆鸿¹, 陈 超², 侯俊利¹

(1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:根据线粒体 D-loop 序列对舟山群岛附近海域的银鲳(Pampus argenteus)群体(n=24)的遗传多样性 进行了研究。通过 PCR 技术对线粒体 D-loop 序列进行扩增,获得大小约为 500 bp 的扩增产物。PCR 产物经纯化并进行序列测定后,得到了 357 bp 的核苷酸片段。在 24 个个体中,共检测到 14 个变异位 点,其中 8 个转换位点,5 个颠换位点,1 个转换与颠换同时存在的位点。运用 MEGA 软件计算出不同 个体间的遗传距离,并根据其遗传距离构建了 UPGMA 和 NJ 系统树。DNASP 软件计算出的单倍型多 样性(h)、核苷酸多样性(π)及平均核苷酸差异数(k)分别为 0.89、0.007 与 2.57。此外,岐点分布及中性 检验显示,东海银鲳群体在历史上可能经历过种群扩张。研究结果表明,线粒体 D-loop 基因可用于银 鲳群体内及群体间遗传多样性的分析。

关键词:银鲳(Pampus argenteus);东海;线粒体 DNA; D-loop 序列 中图分类号:S968.3 文献标识码:A 文章编号:1000-3096(2010)02-0028-05

银鲳(Pampus argenteus)是一种重要的海产经济 鱼类,具有巨大的市场需求,广泛分布于东海、东南 亚海、波斯湾、阿拉伯海和印度洋^[1,2]。近年来,由 于过度捕捞其全球捕捞产量已显著降低^[3]。中国鲳属 鱼类资源的状况也并不容乐观,从最新的调查和日 常监测结果来看,鲳鱼资源受到了严重的破坏,过 度捕捞不仅严重影响了捕捞种类的群体数量,而且 改变了鲳鱼的群体组成结构^[4]。以往有关东海银鲳的 研究主要集中在其渔业资源学^[5,6]、繁殖生物学^[7~10] 及其人工育苗^[11]等方面,其遗传多样性方面的研究 国内尚未见有相关报道。

线粒体基因组(mtDNA)具有结构简单、母系遗 传、进化速率快、几乎不发生重组等特点,业已成为 研究种内、种间近缘群体间遗传分化关系的有效工 具之一^[12]。本研究对东海区银鲳线粒体 DNA 控制 区(D-loop)序列进行 PCR 扩增和测序以分析东海区 银鲳群体的遗传多样性,研究结果可为制定合理的 资源增殖与保护措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

24 尾银鲳样品采自舟山群岛附近海域,平均叉

长为 15.5 cm, 平均体质量为 114.3 g, 取背部肌肉组 织, 置于 95%乙醇中保存, 存放于-20℃中保存 待用。

1.2 DNA 的提取、扩增及测序

分别从 24 尾银鲳样品中取 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^[13], DNA 经沉淀、洗涤并干燥后,溶于 50 μL TE 缓冲液 中,于-20℃中保存备用。

扩增所用引物为,L15926: 5'-TCAAAGCTTACA-CCAGTCTTGTAAACC-3',H16498:5'-CCTGAAGT-AGGAACCAGATG-3'^[14]。每个 PCR 反应总体积为 50 µL,其中 29.6 µL 超纯水、5 µL 10 × PCR 缓冲液、 2 µL 10 mm dNTPs、5 µL 25 mm MgCl₂、4 µL 10 mm 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℃预变性 2 min,然后进行 35 个循环

海洋科学 / 2010 年 / 第 34 卷 / 第 2 期

收稿日期: 2009-03-20; 修回日期: 2009-07-03

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(东 2008M14, 东 2007Z02)

作者简介: 彭士明(1980-), 男, 山东东营人, 博士, 助理研究员, 研究 方向: 水生动物营养学与种质资源学, E-mail: shiming.peng@163.com; 施兆鸿, 通信作者, E-mail: shizhh@sh163.net

(94℃ 45 s, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min), 72℃延伸 7 min, 10℃保温。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统观察并拍照。

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 数据分析

利用 Clustal $X^{[15]}$ 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^[16]分析 不同序列间的碱基组成、变异位点、简约信息位点 等,并计算个体间的遗传距离,构建 UPGMA 与 NJ 系统树。用 DNASP4.0^[17] 计算单倍型多态性(*h*)和核 苷酸多样性(π)等遗传多样性指数。使用 Arlequin 3.0^[18]进行歧点分布分析(Mismatch distribution)^[19]、 Tajima 检验(*D* test)^[20] 和 Fu 检验(*Fs* neutrality

表 1 变异位点在 24 条银鲳 D-loop 序列中的分布

test)^[21],用以进行种群历史分析。

2 结果

2.1 D-loop 片段的序列特征及其多态性

经电泳检测, PCR 扩增产物为大小约为 500 bp 的 1 条整齐而清晰的条带。本研究共测定了银鲳 24 个个体的 mtDNA D-loop 序列片段,在除去引物及部 分端部序列后,经 BLAST 对比,获得银鲳线粒体 D-loop 序列 5'端的长度为 357 bp 的片段。

A、T、C、G 4 种碱基在 24 个个体中的平均比 例分别为 40.1%、30.6%、16.7%、12.6%, AT 比例 (70.7%)高于 GC(29.3%), 符合脊椎动物 mtDNA D-loop 区域碱基组成的特点。D-loop 序列变异位点 在银鲳群体中的分布如表 1 所示。357 bp 长度的核 苷酸序列中共检测到 14 个变异位点, 其中 8 个转

Tab. 1	Distribution of variable sites in 24 individuals of silver pomfret
-	

样品 编号														
-1.5						1	2	2	2	2	2	3	3	3
	3	5	7	0	0	0	1	2	2	4	6	0	1	3
	3	1	2	9 1	8	5	1	2 0	0	4	2	3	2	0
F6	4	1	T	т Т	о Т	^	т	т	G	G	G	Т	Z T	G
E0 E18	л л	л л	ſ	т	Т	л л	Т	т	G	4	G	Т	Т	G
E13	л л	л л	т	т	ſ	л л	Т	т	G	л л	G	Т	Т	4
E13	Δ	Δ	Т	Т	C C	Δ	Т	Т	G	Δ	G	Т	Т	Δ
E14	Δ	Δ	Т	Т	C C	Δ	C I	Т	G	Δ	G	Т	Т	G
E12 E8	G	A	Т	A	C	G	Т	Т	A	A	G	Т	Т	G
E19	G	A	Т	A	C	G	Т	Т	A	A	G	T	Т	G
E1	G	A	Т	A	C	G	Т	Т	A	A	G	T	T	G
E9	A	A	Т	Т	C	G	T	T	A	A	Т	T	T	G
E15	A	A	T	T	C	G	T	T	A	A	G	T	T	G
E3	Α	A	Т	Т	C	G	Т	Т	A	A	G	Т	Т	G
E11	А	А	Т	Т	C	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E2	А	А	Т	Т	С	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E7	А	А	Т	Т	С	G	Т	А	А	А	G	Т	Т	G
E4	А	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E21	А	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E5	А	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E24	А	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E23	А	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E17	А	G	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E22	А	G	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E20	А	А	Т	Т	Т	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E16	А	А	Т	Т	С	G	Т	Т	А	А	G	Т	Т	G
E10	А	А	Т	Т	С	Т	Т	Т	А	Α	G	А	G	G

. ..

换位点, 5 个颠换位点, 1 个转换与颠换同时存在的 位点。

2.2 群体的遗传多样性及其个体间的遗传 关系

通过 DNASP 4.0 软件计算出这 24 个个体的遗传 多样性参数为: 多态位点数(*S*)为 14, 单倍型个数(*H*) 为 11, 单倍型多样性(*h*)为 0.89, 核苷酸多样性(*π*)为 0.007, 平均核苷酸差异数(*k*)为 2.57。由此可以看出, 该群体银鲳具有较高的单倍型多样性, 但核苷酸多 样性较低。

应用 MEGA 4.0 软件, 根据线粒体 D-loop 序列 算出 24 个个体间的 Kimura 2-parameter 遗传距离, 个体间的遗传距离在 0.000~0.017 之间, 其中遗传距 离达到 0.017 的共有 8 组, 而遗传距离 > 0.01 的至少 有 80 组。以 24 个个体的 D-loop 序列构建的 UPGMA 系统树和 NJ 系统树分别如图 1、图 2 所示。由图 1 和图 2 可以看出, 2 种方法获得的系统树的拓扑结构 基本一致, 24 个个体均形成 2 大分支。

2.3 种群历史分析

歧点分布分析表明(图 3), 歧点分布呈单峰状, 图中曲线表示在突然扩张假设理论下歧点分布的模 拟值,同时无限突变位点模型的中性检验值 Tajima's D(-1.106, P = 0.138) 和 Fs(-26.601, P = 0.000) 都 是负值。结果提示东海银鲳群体在历史上可能经历 过种群扩张事件。













3 讨论

通常序列分析(测序)是最为有效的揭示群体遗 传结构的方法之一^[22]。线粒体 DNA (mtDNA)具有分 子小而稳定、母系遗传、进化速率快等特点,成为群 体遗传学的理想分子标记^[12]。控制区(D-loop 区)是 mtDNA 上的一段非编码区,由于受选择压力小,在 进化过程中积累了较多变异,因而被认为是线粒体 基因组上进化最快的部分之一。本研究测序分析了 东海野生银鲳群体线粒体 D-loop 区 5'端的一部分片 段,以此研究分析东海银鲳群体的遗传多样性。

本研究结果显示,东海银鲳群体具有较高的单 倍型多样性(0.89)。已有的资料表明,种群内能够维 持较高单倍型多样性的原因可能在于较大的种群数 量、环境的不均一性或者具有适应种群快速增长的 生活特性^[23]。对于海水鱼类讲,较大的种群数量是维 持较高遗传多样性的基础^[24]。银鲳分布较广,间接说

海洋科学 / 2010 年 / 第 34 卷 / 第 2 期

明其具有较大的种群数量,此可能是其维持较高遗 传多样性的基础。本研究结果还显示,东海银鲳群体 虽具有较高的单倍型多样性、但其核苷酸多样性较 低(0.007)。根据不同单倍型多样性与核苷酸多样性 间的组合,海水鱼类大致可以分为4个类型:第一种 类型是低的单倍型多样性与低的核苷酸多样性;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^[25]。本试验的结果为高的单倍型多样性与低 的核苷酸多样性属于第二种类型。已有的研究表明、 鲸鲨(*Rhincodon typus*)($h = 0.90, \pi = 0.005$)^[26], 尖吻 鲭鲨(Isurus oxvrinchus)($h=0.76, \pi=0.0035$)、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= 0.79~0.98, π= 0.0029~0.0068)均属于此种 类型^[25]。本研究中 24 个个体的 D-loop 序列所构建的 UPGMA 系统树和 NJ 系统树表明, 两种方法所得到 的系统树的拓扑结构基本一致,24个个体均形成两大 分支,由于线粒体 DNA 属于母系遗传,由此可推断 该群体的24个个体可能来源于两个不同的母系祖先。

通常有两种方法检验种群在历史上是否发生过 种群扩张。一是采用 Fu^[21]的 Fs 中性检验显著偏离 中性突变, 负的 Fs 值和差异显著的 P 值被认为种群 在历史上有扩张的迹象。二是根据歧点分布曲线是 否呈现多峰或单峰型。若核苷酸岐点分布曲线呈现 单峰分布,且中性检验值显著偏离中性,则群体在 过去可能经受了种群扩张^[20]。本研究结果显示, 歧点 分布呈单峰状,且中性检验值 Tajima's D 为-1.106 (P = 0.138), Fs 为–26.601 (P = 0.000),表明东海银鲳 群体在历史上可能经历过种群扩张事件。

一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。丰富的遗传多样性意味着比较高的适应生存潜力,蕴藏着比较大的进化 潜能以及比较丰富的育种和遗传改良的潜力,而贫乏的遗传多样性则会给物种生存、进化及种质资源的保护和利用带来许多不利影响^[27]。本研究结果显示,东海银鲳群体具有较高的单倍型多样性(0.89),遗传多样性较为丰富。近年来,由于过度捕捞,导致鱼体小型化、渔获物低龄化,严重损害幼鱼资源,造成产量不稳定^[4]。从长远角度看,过度捕捞势必破坏 其遗传多样性和种质资源的稳定性。由于没有之前的相关数据,本研究也无法判定东海银鲳遗传多样 性水平是否由于近年来的过度捕捞而有所降低,同 样也无法确定东海银鲳遗传多样性水平受其影响的 程度。然而,值得注意的是,不能因为目前相对丰富 的遗传多样性水平而忽视对银鲳资源必要的保护与 管理。目前应针对中国范围内不同群体银鲳资源的 遗传多样性展开较为详细的研究工作,以期为今后 的定期遗传多样性检测奠定基础,并根据其遗传多 样性的变化趋势采取相应的保护措施,科学的保护 野生银鲳的种质资源,使其资源能够达到可持续利 用,此也有助于推动渔业产业的长远发展。

本研究仅仅是针对舟山群岛附近海域银鲳资源 遗传多样性的分析,尚不能全面反映中国不同群体 银鲳的遗传多样性水平与群体分化状态。今后应运 用 D-loop 基因分析中国不同地区银鲳群体的遗传背 景,同时应选择 mtDNA 其他不同的基因如 *Cytb*、 *CO I*等,进一步比较研究银鲳群体内及群体间的遗 传多样性,以全面揭示银鲳资源的遗传多样性水平 及其群体分化状况,以期能够合理的开发利用我国 的鲳鱼资源。

参考文献:

- Kagwade P V. Pomfret resources along north-west coast of India [A]. Bombay Research Centre CMFRI. Living Resources of the Indian Seas [C]. Bombay, India, 1988. 219-224.
- [2] Almatar S M, Al-Abdul-Elah K, Abu-Rezq T. Larval developmental stages of laboratory-reared silver pomfret, *Pampus argenteus* [J]. Ichthyological Research, 2000, 47: 137-141.
- [3] Wen T Y, Jian L, Gen H Y. Multiplex genotyping of novel microsatellites from silver pomfret (*Pampus ar-genteus*) and cross-amplification in other pomfret species [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 1 073-1 075.
- [4] 郑元甲,陈雪忠,程家骅,等.东海大陆架生物资源
 与环境 [M].上海:上海科学技术出版社,2003.
 379-400.
- [5] 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.
- [6] 何正侃, 孙振中, 洪波. 长江口南岸水域银鲳及幼鱼 资源动态监测[J]. 水产科技情报, 2006, 33(2): 81-83.
- [7] 龚启祥, 倪海儿, 李伦平, 等. 东海银鲳卵巢周年变 化的组织学观察[J]. 水产学报, 1989, 13(4): 316-325.
- [8] 倪海儿,龚启祥.东海银鲳个体生殖力的研究[J].浙 江水产学院学报,1995,14(2):118-122.
- [9] 施兆鸿,王建钢,高露姣,等.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.
- [10] 施兆鸿, 高露姣, 谢营梁, 等. 渔场银鲳和灰鲳繁殖 特性的比较[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 647-652.
- [11] 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.

- [12] Aquadro C F, Greenberg B D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals [J]. Genetics, 1983, 103: 287-312.
- [13] Sambrook J, Fritsch E P, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratories Press, 1989.
- [14] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86: 6 196-6 200.
- [15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal-windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4 876-4 882.
- [16] 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: 1 596-1 599.
- [17] Rozas J, Sanchez-Delbarrio C J, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods [J]. **Bioinfomatics**, 2003, 19: 2 496-2 497.
- [18] 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.

- [19] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic difference [J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9: 552- 569.
- [20] Tajima F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. Genetics, 1989, 123: 585-595.
- [21] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. **Genetics**, 1997, 147: 915-925.
- [22] Buonnacorsi V P, McDowell J R, Graves J E. Reconciling patterns of interocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*) [J]. **Mol Ecol**, 2001, 10: 1 179-1 196.
- [23] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [24] Avise J. Phylogeography [M]. MA: Harvard University Press, Cambridge.1998.
- [25] 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.
- [26] Ramirez-Macias D, Vazquez-Juarez R, Galvan-Magana F, et al. Variations of the mitochondrial control region sequence in whale sharks (*Rhincodon typus*) from the Gulf of California, Mexico [J]. Fisheries Research, 2007, 84: 87-95.
- [27] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.

Genetic diversity analysis of silver pomfret (*Pampus argenteus*) in the East China Sea based on mtDNA D-loop sequence

PENG Shi-ming¹, SHI Zhao-hong¹, CHEN Chao², HOU Jun-li¹

(1.East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Mar., 20, 2009

Key words: Pampus argenteus; East China Sea; mitochondrial DNA; D-loop sequence

Abstract: Genetic diversity of silver pomfret (*Pampus argenteus*) in the East China Sea was investigated based on mtDNA D-loop sequences. The PCR technique was used to amplify the mtDNA D-loop in 24 individuals of silver pomfret collected from the East China Sea, near the coast waters of Zhoushan Islands. The PCR products were purified and sequenced. The results showed that 357bp nucleotide sequences of partial D-loop gene were obtained (the primer and some of the marginal sequences were excluded). Among the 24 individuals, 14 variation sites were observed, of which there were 8 transition sites, 5 transversion sites and 1 transition-transversion sites. The paiwise genetic distances were computed by MEGA software. The UPGMA and NJ phylogenetic trees were obtained through the cluster analysis over the pairwise genetic distance. The haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π) and average number of pairwise nucleotide differences (k) were calculated by DNASP software, which were 0.89, 0.007 and 2.57, respectively. Mismatch distribution analysis and Neutrality tests indicated a possible population expansion in silver pomfret population of the East China Sea. In conclusion, mtDNA D-loop may be one of the genetic markers available for scanning genetic diversity of intra-population and inter-populations of silver pomfret.

(本文编辑:康亦兼)