

不同海域中国花鲈的细胞色素 b 序列的遗传分析

刘明月, 蒋琦辰, 杨家新

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 从辽宁大连、河北黄骅、山东青岛、江苏盐城、浙江宁波、广西北海等 6 个沿海地区分别采集野生中国花鲈共 44 尾, 通过测定花鲈细胞色素 b 序列, 获得 876 bp 长度的序列, 检测到的变异位点 26 个, 22 个单倍型, A、C、G、T 的碱基组成分别为 22.6%, 33.1%, 16.4%, 28.0%。各群体内的遗传差异从 0.1% ~ 1%, 群体间的遗传差异从 0.2% ~ 1%。构建 NJ 树, 分为两大群, 取自北海的花鲈单独成群, 其它地区的花鲈合为另一分支。

[关键词] 中国花鲈, 线粒体 DNA, 细胞色素 b 序列分析

[中图分类号] S965.211 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)01-0102-05

Analysis on Mitochondrial DNA Cytochrome b Gene of *Lateolabrax japonicus* From Different Seas

Liu Mingyue, Jiang Qichen, Yang Jiaxin

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract The mitochondrial DNA cytochrome b (Cytb) gene of *Lateolabrax japonicus* samples collected from Dalian (DL), Huanghua (HH), Qingdao (QD), Yancheng (YC), Ningbo (NB) and Beihai (BH) were amplified with PCR technique and DNA sequencing. The results showed that 26 nucleotide sites were variable among 876 bp length of homologous sequence. A total of 22 haplotypes found in all 44 individuals. The average A, C, G and T contents in Cytb gene were 22.6%, 33.1%, 16.4% and 28.0%, respectively. Sequence divergence of Cytb of *Lateolabrax japonicus* within the same area was 0.1% ~ 1%, among the 6 populations was 0.2% ~ 1%. Molecular phylogenetic tree was constructed with NJ method. The results showed *Lateolabrax japonicus* from Beihai could be clustered as one independent group, others were clustered as the other group and mixed to each other.

Key words *Lateolabrax japonicus*, mitochondrial DNA, cytochrome b (Cytb), sequencing

花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 又称鲈鱼、寨花、七星鲈鱼等, 属鲈形目 (Perciformes), 鲈科 (Scorpaenidae), 花鲈属 (*Lateolabrax*), 是海水养殖的主要经济鱼种之一^[1, 2]。花鲈是高等真骨鱼类, 为东北亚特有亚种之一, 广布于太平洋西岸水域。花鲈个体大, 肉味美, 生长快, 在国内外市场颇受欢迎^[3]。我国曾拥有丰富的花鲈资源, 但是近些年来, 由于过度捕捞, 环境污染, 导致花鲈资源量下降, 种质退化。目前, 学者们对中国花鲈的育种^[4-7], 营养学^[8, 9]以及中日花鲈的分类学^[10-15]进行过研究, 关于中国不同海域花鲈种质资源和种群分类上却仍存在一些问題, 有必要进一步研究证实。

线粒体基因组具有结构简单、母系遗传、进化速度快、几乎不发生重组等特点。其进化速度是单拷贝基因的 5-10 倍^[16]。后代的基因一般能保持祖先的类型, 这就形成了利用其探索种群遗传变异的基础, 这对于理解种群遗传结构和进化关系具有很高的价值^[17]。线粒体 DNA 上的细胞色素 b 基因进化速率适中, 一个较小的基因片段就包含着从种内到种间乃至到科间的进化信息, 因而被广泛应用来进行脊椎动物种上和种下分类阶元的系统进化研究, 被认为是解决系统发育问题最可信的线粒体 DNA 标记之一^[18]。目前, 细胞色素 b 基因被广泛的应用于鱼类系统进化、种群遗传结构和亲缘地理学研究等^[19-22]方面。关于中国花鲈种群分类研究较少, 没有明确的定论^[1], 因此, 本实验拟通过测序法获得不同海域中国花鲈细胞色素

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 江苏省海洋生物技术开放实验室项目 (编号: 2007H S007)。

通讯联系人: 杨家新, 教授, 博士, 研究方向: 水产养殖。E-mail: yangjiaxin@njnu.edu.cn

b 的基因片段序列, 了解不同水体中国花鲈的遗传特征和差异, 保护我们国家花鲈的野生资源以及养殖开发应用.

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的野生花鲈分别采集于辽宁大连 (DL)、河北黄骅 (HH)、山东青岛 (QD)、江苏盐城 (YC)、浙江宁波 (NB)、广西北海 (BH), 共 44 尾, 于 - 20℃ 低温保存.

1.2 基因组 DNA 提取

取各个地方的中国花鲈背部肌肉 30mg 按照 DNA Extraction Kit (上海捷瑞有限公司) 要求提取基因组 DNA.

1.3 基因扩增与测序

根据自行设计的 PCR 引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 中国花鲈细胞色素 b 基因片段的引物为 Cytb-F: ATGGCAAGCCTTCGAAAAAC (20 bp), Cytb-R: ATGCCTCCGATTCAGGTGAG (20 bp). PCR 反应总体积为 30μL, 其中 10×Buffer 3 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 正反向引物各 1 μL, Taq 酶 0.3 U, 模板 DNA 1.5 μL. PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 10 min, 然后 94℃ 预变性 1 min, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min. 利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照, 以检查是否存在污染. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测结果于凝胶成像系统中观察. PCR 产物经 TaKaRa PCR 产物纯化试剂盒纯化, 送至上海生工生物工程技术有限公司用 ABI 377 自动测序仪进行双向测序.

1.4 序列分析

双向测序正反两条链用 SeqMan 拼接, 并人工校对后, 用 ClustalX 1.8^[10] 进行比对. 应用 Mega4.0^[11] 统计变异位点并分析单倍型, 计算群体内和群体间的遗传差异. 用 PAUP4.0^[12] 采用邻接法 (Neighbor-Joining NJ) 构建系统发育树, 系统树各分枝的置信度自举检测 (Bootstrap) 1000 次.

2 结果

花鲈各群体的细胞色素 b 均能清晰稳定的扩增, PCR 产物电泳图谱见图 1. 可以看出细胞色素 b 基因长度大约为 1000 bp.

对于采集于 6 个不同地方的中国花鲈个体的细胞色素 b 序列进行比对, 除去首尾两端部分的模糊序列, 共获得长度为 876 bp 的同源序列. 细胞色素 b 基因片段 A、C、G、T 的碱基组成分别为 22.6%, 33.1%, 16.4%, 28.0%, A 和 T 碱基组成 50.6%. 从碱基组成可以看出, 细胞色素 b 表现出很强的碱基组成偏向性, 即在 ACGT 4 种碱基中, G 的含量明显低于其它 3 种碱基的含量, 这与脊椎动物 mtDNA 的特点相一致^[18]. 各个地方花鲈的碱基组成如表 1.

比对 6 个不同水体中中国花鲈细胞色素 b 基因片段, 结果检测到变异位点为 26 个, 占全部序列的 3.0%, 其中转换位点 18 个, 颠换位点 9 个, 如图 2. 44 尾样品中共检测到 22 种单倍型, 根据碱基组成特征, 可以分为 I、II 和 III 型三大类, I 大类型含 4 种, II 大类型含 14 种, III 大类型含 5 种. 三大单倍型在各个群体中的分布频率情况为 I 型单倍型: 大连 2/9, 黄骅 1/8, 青岛 2/10, II 型单倍型: 大连 4/9, 黄骅 2/8, 青岛

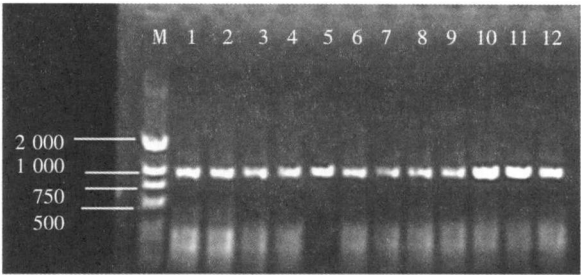


图 1 中国花鲈线粒体 Cytb 基因扩增电泳图谱
Fig. 1 Amplified product of mitochondrial cytb gene of *Lateolabrax japonicus*

M. DNA Marker; 1, 2 为大连花鲈; 3, 4 为黄骅花鲈; 5, 6 为青岛花鲈; 7, 8 盐城花鲈; 9, 10 为宁波花鲈; 11, 12 为北海花鲈.

表 1 不同水体中国花鲈细胞色素 b 碱基组成
Table 1 Base composition of cytb gene in *Lateolabrax japonicus* from different seas

	A %	C %	G %	T /	(A + T) %
大连 (DL)	22.80	33.50	16.20	27.50	50.30
黄骅 (HH)	22.70	33.50	16.20	27.50	50.20
青岛 (QD)	22.80	33.50	16.20	27.50	50.30
盐城 (YC)	22.60	33.50	16.30	27.70	50.30
宁波 (NB)	22.80	33.50	16.00	27.70	50.30
北海 (BH)	22.50	33.50	16.20	27.80	50.30
全部	22.60	33.10	16.40	28.00	50.60

6/10 盐城 4/5 宁波 4/4 北海 8/8 III型单倍型: 大连 3/9 黄骅 5/8 青岛 2/10

6个群体内和群体间的遗传差异见表 2 大连、黄骅、青岛、盐城、宁波、北海遗传差异分别是 0.5%、0.7%、0.3%、0.4%、0.1%、1%, 各个群体之间的遗传差异从 0.2% ~ 1% 之间.

以日本宽真鲈 (*L. latus*) 为外群, 运用 PAUP4. Q 根据细胞色素 b 核苷酸序列构建了不同水体中国花鲈的分子亲缘关系 NJ 树, (见图 3). 从图中可以看出, 中国花鲈分为 2 大支, 取自广西北海的中国花鲈独立成为一支; 其他地区的花鲈形成另一支, 不同个体之间并未单独成群, 相互交叉.

表 2 不同水体中国花鲈细胞色素 b 的遗传差异

Table 2 Sequence divergence of Cytb within and among 6 stocks of *Lateolabrax japonicas* from different seas

	大连 (DL)	黄骅 (HH)	青岛 (QD)	盐城 (YC)	宁波 (NB)	北海 (BH)
大连 (DL)	0.005					
黄骅 (HH)	0.005	0.007				
青岛 (QD)	0.002	0.005	0.003			
盐城 (YC)	0.004	0.007	0.003	0.004		
宁波 (NB)	0.004	0.006	0.002	0.003	0.001	
北海 (BH)	0.005	0.005	0.004	0.007	0.01	0.01

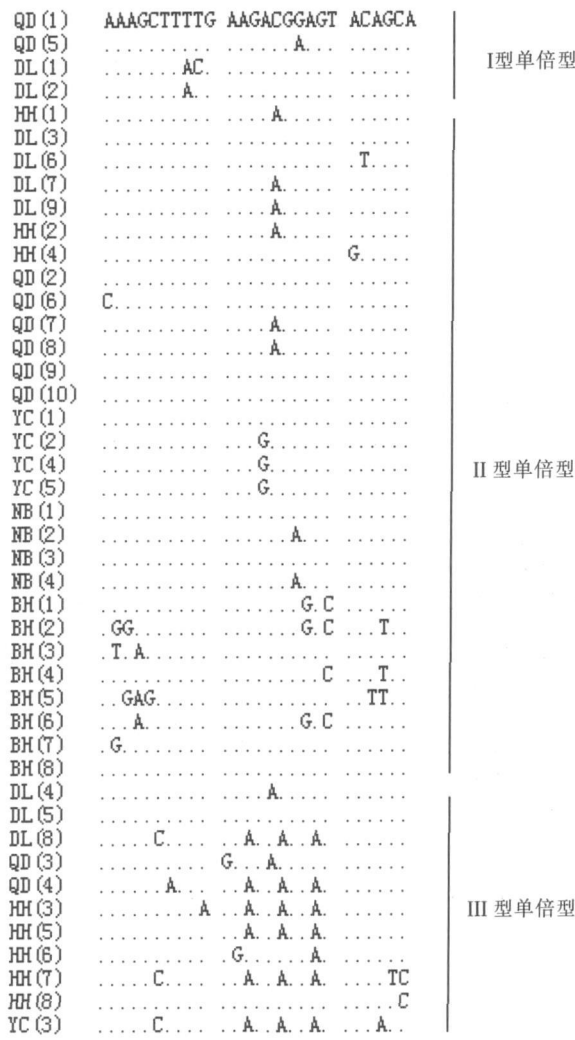


图 2 不同水体中国花鲈细胞色素 b 序列的变异位点和单倍型
Fig.2 Variable sites of Cytb and haplotypes of 6 stocks of *Lateolabrax japonicas*

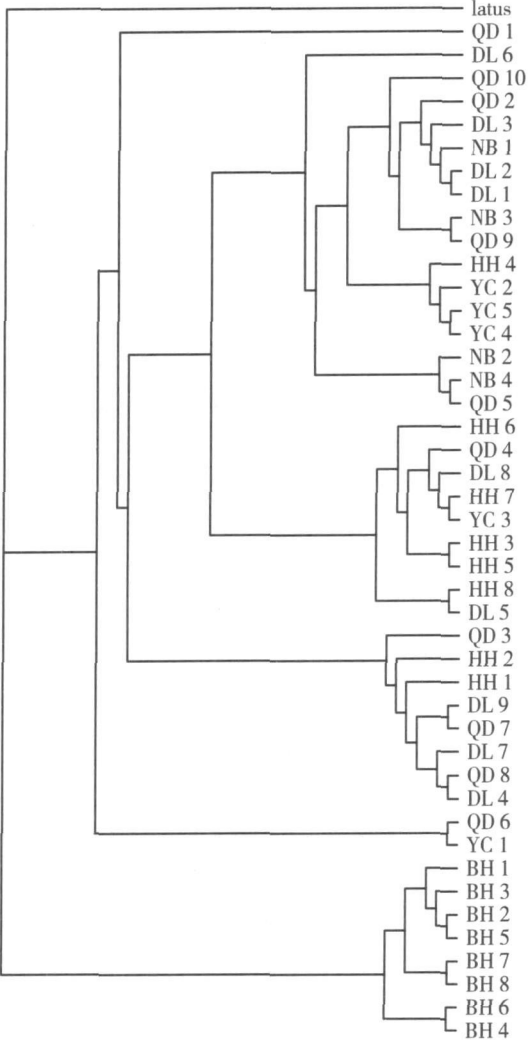


图 3 基于细胞色素 b 基因片段序列构建的 6 个不同水体中国花鲈的 NJ 聚类图
Fig.3 NJ trees based on the Cytb of 6 stocks of *Lateolabrax japonicas* from different seas

3 讨论

花鲈是凶猛的肉食性鱼类, 通常生活在河口区, 具有溯河性洄游, 其肉质鲜美, 是我国重要的名特优水产品之一, 具有巨大的养殖前景. 1854~ 1857 年间, Bleeker 建立了 *Lateolabrax*^[1] (*Percichthys* *Perciformes*), 仅有单一种 *Lateolabrax japonicas* (Cuvier), 后来, Katoyama 叙述了花鲈属另外一种日本宽真鲈 (*L.*

latus)^[23]. 上世纪 90 年代, Yokogawa 和 Seki 经过研究, 认为中国花鲈和日本花鲈在形态学、遗传学和生态学方面存在着差异^[14 15]. 我国学者通过营养成分和同工酶电泳对中日花鲈进行了对比, 证实了中日花鲈之间存在差异^[23 24], 2007 年, 又采用 RAPD 技术进一步证实了将中日花鲈划分为 2 个种的观点^[25]. 在对中日花鲈的研究过程中, 考虑到中国海岸线漫长, 中国花鲈在不同海域是否存在地理隔离, 诸多学者又对中国南北花鲈在营养成分^[26]、同工酶电泳^[27]以及遗传多样性^[28]等方面进行了比较研究, 结果表明中国南北花鲈之间存在着差异, 但对具体种群的划分一直没有明确的定论, 2007 年叶振江等^[29]通过研究中国几个代表地方花鲈的耳石, 认为我国花鲈可能分为舟山种群, 福州-厦门种群和广西种群 3 个种群.

从本实验对中国 6 个沿海代表地区 (分别取自渤海、黄海、东海、南海) 花鲈的细胞色素 b 研究结果来看, 其变异位点仅占全部序列的 3. 0%, 群体内的遗传差异从 0. 001~ 0. 01, 群体间的差异从 0. 002~ 0. 01, 表明不同水体花鲈的遗传差异低, 分化程度不高, 从南到北, 取自北海的花鲈遗传差异最高, 其次是黄骅的花鲈, 而宁波的遗传差异低于大连和青岛, 所以遗传差异从南到北没有呈现明显的规律. 但刘进贤^[30]等研究中日花鲈差异曾提出北方的中国花鲈遗传差异大于南方花鲈, 北海的最低 (0. 008), 本实验研究结果与之不符. 对花鲈的单倍型分析, 发现北海样品全部表现为 II 类型, 从构建的亲缘关系树中也发现北海的花鲈独立成为一支, 与其他地区明显的分开, 这与叶振江建议的划分为广西种群^[29]科研结果一致.

而大连、黄骅、青岛、盐城、宁波的花鲈没有单独成群, 互相交叉, 表明采自黄渤东海的花鲈没有明显分开. 近几年, 由于环境污染加上人为捕获量的增大, 野生品种已经锐减, 加上广东和浙江等地也大量利用北方的鱼苗和亲鱼进行人工养殖, 如果养殖鱼苗大规模逃逸, 流入海域, 就会对当地野生花鲈的遗传结构造成影响, 降低当地花鲈群体的适应性, 导致黄渤东海的花鲈没有单独成群. 另外, 花鲈是一种回游性鱼类, 亲鱼通常于 12 月份至翌年 2 月间在河口沿岸石礁间产卵, 自 10 月份至翌年 3 月份大部回游入海中越冬. 冬季有些幼鱼也随着成鱼向外海移动, 这就有了不同海域花鲈基因交流的可能性. 从地理学上来看, 取自广西北海的花鲈属于南海境内, 与黄渤东海相距较远, 加上海南岛等几个岛屿的相隔, 能形成一个较封闭的环境, 这就为阻碍群体之间基因交流提供了可能性, 所以北海花鲈群体单独成群.

北海野生花鲈表现出很高的遗传多样性, 其种质资源的质量较高, 采自北海的每一个样品都是一种单倍型, 至于其是不是已经有了种间的遗传分化, 还需要进一步扩大样本, 或者采用其他分子标记研究, 从而为保护中国野生花鲈的种质资源提供理论依据.

[参考文献]

- [1] 楼东, 高天翔. 中国花鲈种质资源的研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报, 2000, 19(2): 162-167
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学组. 鱼类分类学 [M]. 北京: 农业出版社, 1995: 597-614
- [3] 毕庶万, 于光溥, 时光营, 等. 黄渤海的鲈鱼资源及增养殖概况 [J]. 水产科技情报, 1995, 22(4): 181-183
- [4] 廖国璋. 花鲈的生态特性及池塘养殖问题 [J]. 水产科技情报, 1998, 25(3): 130-132
- [5] 张美昭, 高天翔, 阮树会, 等. 花鲈亲鱼人工培育与催产技术研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 196-200
- [6] 张春丹, 李星云. 花鲈的繁殖生物学及繁育技术研究进展 [J]. 宁波大学学报, 2005, 18(3): 400-403
- [7] 赵盛龙, 钟俊生, 木下泉, 等. 杭州湾湾口与日本有明海产花鲈稚鱼的比较研究 [J]. 水产学报, 2005, 29(5): 670-675
- [8] 苏传福. 花鲈营养需求研究进展 [J]. 渔业经济研究, 2005, 4: 35-38
- [9] 王艳, 胡先成, 罗颖. 盐度对鲈鱼稚鱼的生长及脂肪酸组成的影响 [J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2007, 24(2): 62-66
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al The ClustalK windows interface flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acid Research, 1997, 25: 4876-4882
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M, et al MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163
- [12] Masatoshi Nei, Sudhir Kumar 分子进化与系统发育 [M]. 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍译. 北京: 高等教育出版社, 2002
- [13] Koji Yokogawa Genetic divergence of fishes in genus Lateolabrax [J]. Suisanzoshoku, 1998, 46(3): 315-320
- [14] Koji Yokogawa, Shingo Seki Morphological and genetic differences between Japanese and Chinese sea bass of the genus Lateolabrax [J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1995, 41(4): 437-445
- [15] Jung Y P. Genetic characterization of two types of sea bass Lateolabrax japonicus in Korea by isozyme analysis [J]. Journal of Aquaculture, 1996, 9(4): 437-444

- [16] Avise J C, Ellis D. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals[and discussion] [J]. Phil Trans R Soc Lond B, 1986, 312: 325-342
- [17] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究进展 [J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983-1 000
- [18] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein-coding genes in resolving relationship among Vertebrates[J]. Molecular Biology and Evolution, 1996, 13: 933-942
- [19] 彭作刚, 张耀光, 何舜平, 等. 从细胞色素 b 基因序列变异分析中国鲎形目鱼类的系统发育 [J]. 遗传学报, 2005, 32(2): 145-154
- [20] 李娜, 陈少波, 谢起浪, 等. 闽浙地区香鱼线粒体 Cytb 基因和 D-loop 区序列多态性分析 [J]. 遗传, 2008, 30(7): 919-925
- [21] 唐琼英, 杨秀平, 刘焕章. 刺鲃基于线粒体细胞色素 b 基因的生物地理学过程 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 352-356
- [22] 杨金权, 刘焕章. 两种鲮科鱼类在长江和珠江流域 Cytb 基因序列变异性分析 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 253-257
- [23] 王远红, 吕志华, 高天翔, 等. 中国花鲈与日本花鲈营养成分的研究 [J]. 海洋水产研究, 2003, 24(2): 35-39
- [24] 楼东, 高天翔, 张秀梅, 等. 中日花鲈生化遗传变异的初步研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 22-28
- [25] 胡自民, 高天翔, 韩志强, 等. 花鲈和鲈鱼群体的遗传进化研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(5): 413-418
- [26] 王远红, 吕志华, 高天翔, 等. 不同海域中国营养成分的比较研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(4): 531-536
- [27] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈的遗传变异分析 [J]. 浙江海洋学院学报, 2003, 22(2): 121-124
- [28] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 遗传多样性的 RAPD 研究 [J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6): 618-623
- [29] 叶振江, 孟晓梦, 高天翔, 等. 两种花鲈 (*Latolabrax* sp) 耳石形态的地理变异 [J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(4): 356-360
- [30] Jirxian Li, Tian-Xiang Gao, Koji et al. Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Latolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006(39): 799-811

[责任编辑: 孙德泉]