

黄海蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列变异分析

姜艳艳^{1,2}, 孔晓瑜¹, 喻子牛¹, 庄志猛², 金显仕²

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 农业部海洋渔业资源
可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院, 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:采用聚合酶链式反应(PCR)技术对山东半岛南岸水域的蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)群体($n=20$)的 mtDNA D-loop 序列进行扩增, 获得了大小约为 500 bp 的扩增产物。PCR 产物经纯化后进行序列测定, 得到了 410 bp 的核苷酸片段(除去引物及部分端部序列)。用 Genedoc 软件进行排序比较, 在这 20 个个体中, 共检测到 54 个变异位点, 包括 2 个碱基缺失、1 个碱基插入、43 个转换位点、7 个颠换位点及 2 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, 并据此构建了 UPGMA 和 NJ 系统树。用 DNASP 软件计算出的多态位点数(S)为 54、核苷酸多样性(P_d)和平均核苷酸差异数(K)分别为 0.027 1 和 11.047。研究表明, 蓝点马鲛的 mtDNA D-loop 基因个体变异程度较大, 适合于群体内及群体间不同个体的遗传多样性分析。

关键词:蓝点马鲛; mtDNA; D-loop; 遗传多样性

中图分类号: Q959.479

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)03-0177-07

蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*), 俗称为马加、马鲛、鲅鱼等, 广泛分布于东北亚水域, 为营长距离洄游的暖温性大型中上层经济鱼类, 具有生长迅速(1 个月的体长增长达 10 mm、在 5~11 月的 1 个生长季节内便可达商品规格)、性成熟早、种群结构较简单、世代更新快等特点, 可望成为重要的增殖对象^[1]。自 20 世纪 50 年代以来, 蓝点马鲛一直是我国黄渤海和东海海区最为重要的渔业对象之一^[2]。但 20 世纪 70 年代后期起, 由于秋汛拖网渔业过多地捕捞当年幼鱼资源, 致使渔获组成低龄化, 资源受到严重破坏。以往有关东海蓝点马鲛的研究主要集中在渔业资源学方面^[3-7], 已有学者根据其形态特征, 采用计数性状及量度性状对东海蓝点马鲛的种群进行鉴别^[6]。迄今, 国内尚未见蓝点马鲛遗传多样性方面的研究报道。

线粒体 DNA(mtDNA)具有进化速率快、群体内

变异大、分子结构简单、基本序列清楚及严格的母系遗传等特点, 已成为种内、种间近缘群体间遗传分化关系研究的有力工具^[8]。本研究对分布于黄渤海的蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列进行 PCR 扩增和测序以分析该蓝点马鲛群体的遗传多样性, 旨在制定合理的资源增殖和保护措施提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

40 尾蓝点马鲛样品于 2001 年 5 月下旬采自山东半岛南岸水域, 平均叉长为 420.8 mm, 平均体重为 612.2 g, 均为 1 龄鱼。取尾部肌肉于低温冰箱中保存(-70℃)备用。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取 从 40 尾蓝点马鲛样品中随机选取了 20 个个体, 取 0.1 g 肌肉组织以提取总 DNA。总 DNA 的提取按常规的“酚-氯仿”方法进行^[9], DNA 经异丙醇沉淀、70% (体积分数)乙醇洗涤并干燥后, 用 100 μ L 超纯水溶解, -20℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 采用 PCR 扩增 mtDNA D-loop 区靠近 Cyto b 基因的部分苏氨酸 tRNA(tRNA^{Thr})基

收稿日期: 2002-09-02; 修订日期: 2002-11-28.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(G19990437); 山东省自然科学基金资助项目(Y2000D04).

作者简介: 姜艳艳(1976-), 女, 硕士研究生, 从事海洋分子生物学研究.

通讯作者: 喻子牛, E-mail: carlzyu@ouc.edu.cn

因、全部脯氨酸 tRNA (tRNA^{Phe}) 基因和其后的 D-loop 绝大部分区域,所用正链引物和反链引物^[10]分别为:

D1 (L15926): 5' - TCAAAGCTTACACCACTCTTGTAAC - 3' 和 D2 (H16498): 5' - CCTGAAGTAGGAACCATG - 3'。

每个 PCR 反应总体积为 30 μ L, 其中模板 DNA 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.4 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, Taq 聚合酶 (5U/ μ L) 0.2 μ L, 3.0 μ L 缓冲液 (1 $\times$ 10, 含 Mg²⁺) 和适量的去离子双蒸水。

在 PTC-100 PCR 仪上进行 PCR 反应, 采用热启动 PCR (80 $^{\circ}$ C), 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后进行 33 个热循环 (94 $^{\circ}$ C、45 s, 52 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 10 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统观察并照像。

1.2.3 PCR 产物测序 PCR 产物经试剂盒 (SK142, 上海生工) 纯化后, 由 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM BigDye TM Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit 及 AmpliTaq DNA polymerase 在 PCR 仪上进行测序反应, 产物纯化后在 ABI PRISM 377XL DNA 测序仪上进行单向测序, 测序结果进行人工核对、校正; Genedoc 软件进行排序比较; MEGA 软件计算个体间的遗传距离, 并构建 UPCMA 和 NJ 系统树; DNASP 软件计算遗传多样性参数。

2 结果与讨论

2.1 目的片段的序列特征及群体内的序列变异

目的 DNA PCR 扩增产物的电泳检测结果如图 1 所示。可以看到大小约为 500 bp 的 1 条整齐而清晰的条带。

本研究共测定了蓝点马鲛 20 个个体的 mtDNA D-loop 序列片段, 在除去引物及部分端部序列后, 其碱基序列长度为 410 bp。利用 BLAST 与 GENBANK 中线粒体 DNA 序列进行比较, 结果表明与脊椎动物的相同序列片段部分有很高的同源性 (大于 86%)。

A、T、C、G 4 种碱基在 20 个个体中的平均含量分别为 31.42% (30.81% ~ 31.95%)、37.22% (36.34% ~ 37.80%)、11.93% (11.46% ~ 12.68%)、19.43% (18.78% ~ 20.05%), AT 含量 (68.64%) 高于 GC 含量 (31.36%)。结果表明, 蓝点马鲛 mtDNA D-loop 基因的 AT 含量与梭鱼 D-

loop 基因的 AT 含量 (65%) 和中华鲟 D-loop 基因的 AT 含量 (58.1%) 非常接近^[11-12], 这也符合脊椎动物 mtDNA D-loop 区域碱基组成的特点。

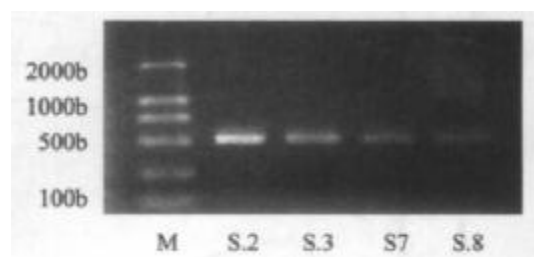


图1 目的 DNA 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplified products of D-loop in Spanish mackerel

M: DL2000 分子标记;

S.2, S.3, S.7, S.8: 分别为蓝点马鲛的 4 个个体。

M: DL2000 Marker;

S.2, S.3, S.7, S.8: Four individuals of Spanish mackerel.

D-loop 序列变异位点在蓝点马鲛群体中的分布如表 1 所示。410 bp 长度的核苷酸序列中共检测到 54 个变异位点, 其中存在 2 个碱基缺失 (位点 97、138), 1 个碱基插入 (位点 173), 43 个转换位点 (A-G、C-T), 7 个颠换位点 (位点 3、7、8、11、21、85、139) 及 2 个转换与颠换同时存在的位点 (位点 16、108)。结果可以看出, 在 410 bp 的核苷酸序列中, 93% 的变异位点分布在 1 ~ 300 bp, 而颠换位点则集中分布在 1 ~ 100 bp。

2.2 群体内遗传多样性分析

2.2.1 遗传多样性参数 通过 DNASP (3.50) 软件计算出这 20 个个体的遗传多样性参数: 多态位点数 (S) 为 54, 核苷酸多样性 (P_i) 为 0.027 1, 平均核苷酸差异数 (K) 为 11.047, 可见, 该蓝点马鲛群体的遗传多样性较为丰富。近年来, mtDNA 的研究不断深入, 其 D 环是 mtDNA 中不编码多肽链的核苷酸片段, 无修复系统, 不受选择压力的影响, 因而积累了较多的变异^[13]。mtDNA 母系遗传特性使得相对少的个体即可代表该群体的有效样本 (有效群体小), 反映出遗传变异情况, 因此, 这些参数已能代表该群体的 D 环序列的变异水平。

本研究所得的蓝点马鲛遗传多样性参数 (S , P_i 和 K) 较梭鱼的 D-loop 数值 ($S=26$, $P_i=0.01387$, $K=6.643$)^[14] 及中华鲟的 D-loop 数值 ($S=38$, $P_i=0.0125$, $K=5.2061$)^[12] 高, 这种现象一方面可能与种类差异有关; 另一方面, 可能与蓝点马鲛的栖

息地多样性,活动范围大有关,因为蓝点马鲛广泛分布于东黄海、渤海近岸水域的产卵场、索饵场和越冬场,并作长距离洄游。此外,蓝点马鲛不同于梭鱼等其他增殖鱼类,尚未受到由于人工苗种培育而导致的近交等方面的影响,因而具有较丰富的遗传多样性。

2.2.2 个体间的遗传关系 应用 MEGA2 软件,根据 D-loop 序列算出了 20 个个体间的 Kumar 遗传距离(表 2)。从表 2 可见,①20 个个体中任何 2 个个体间的遗传距离均不为 0.00,即任何 2 个个体的

核苷酸序列不完全相同,故共有 20 种单倍型;②最大值 0.059 为个体 S.8 与 S.29 之间的遗传距离;③最小值 0.002 为个体 S.7 与 S.30 之间的遗传距离。

以 20 个个体的 D-loop 序列构建的 UPGMA 系统树和 NJ 系统树分别如图 2、图 3 所示。从图中可以看出,2 种方法得到的系统树的拓扑结构基本一致,20 个个体形成了 2 大分支。线粒体 DNA 属于母系遗传,可推断该群体的 20 个个体可能来源于 2 个不同的母系祖先^[15]。

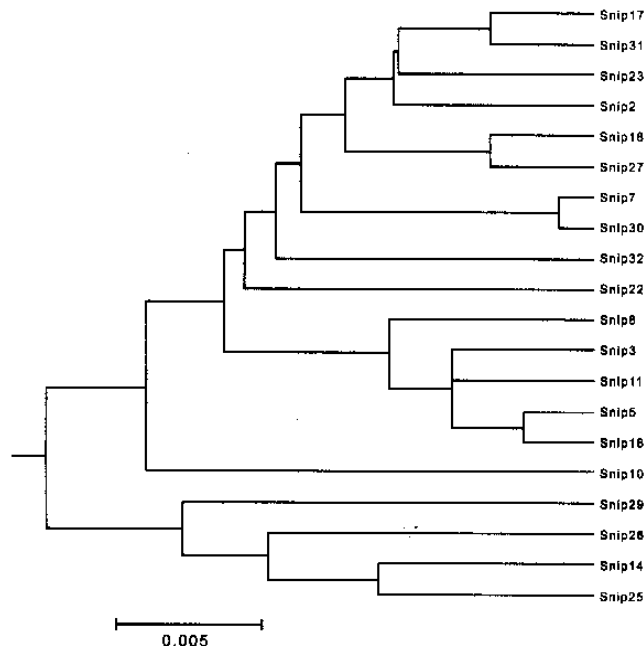


图 2 由 D-loop 序列得到的 UPGMA 系统树

Fig. 2 UPGMA phylogenetic tree based on D-loop sequences

3 结论

本研究从 D 环序列获得的群体遗传多样性参数和个体间的遗传关系都表明,蓝点马鲛山东半岛南岸水域群体目前的遗传多样性非常丰富。从遗传学和进化角度看,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。物种的遗传多样性越丰富,其适应能力、生存能力和进化潜力就越大,或者说遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化潜力提供了潜在的遗传基础和储备。反之,遗传多样性的降低可导致其适应能力、生存

能力降低,物种退化,极端情况下甚至威胁物种生存^[16]。近年来由于盲目发展流网数量,网目缩小以及秋后大量拖捕当年幼鱼,致使鱼体小型化、渔获组成低龄化,严重损害幼鱼资源,造成产量不稳^[2]。长此以往,将会损害其遗传多样性和种质资源的稳定性。因为没有以前的数据作参照,本研究无法判定蓝点马鲛山东半岛南岸水域群体的遗传多样性水平是否由于近年来过度捕捞有所降低,也不能肯定遗传多样性水平受其影响的程度。当然,更不能因为目前的相对丰富的遗传多样性水平而忽视必要的保护和管理措施,相反,应广泛地分析各群体的遗传

表1 变异位点在20条蓝点马鲛D-loop序列中的分布

Table 1 Distribution of D-loop variable sites in 20 individuals of Spanish mackerel

个体编号 sample No.	变 异 位 点 Variable sites																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
S. nip2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S. nip32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Majority	A	C	T	A	C	C	T	T	C	T	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T

表2 蓝点马蚊不同个体间 D-loop 序列的 Kumar 遗传距离
Table 2 Kumar genetic distance of 20 Spanish mackerels as revealed by D-loop sequences

	S. nip2	S. nip3	S. nip5	S. nip7	S. nip8	S. nip10	S. nip11	S. nip14	S. nip16	S. nip17	S. nip18	S. nip22	S. nip23	S. nip25	S. nip26	S. nip27	S. nip29	S. nip30	S. nip31	S. nip32
S. nip2																				
S. nip3	0.015																			
S. nip5	0.018	0.007																		
S. nip7	0.020	0.020	0.023																	
S. nip8	0.033	0.017	0.015	0.038																
S. nip10	0.033	0.028	0.030	0.033	0.020															
S. nip11	0.025	0.010	0.007	0.030	0.010	0.025														
S. nip14	1.932	1.900	1.869	1.932	1.841	1.785	1.900													
S. nip16	1.840	1.814	1.786	1.840	1.761	1.710	1.814	0.044												
S. nip17	1.786	1.764	1.737	1.786	1.714	1.666	1.764	0.033	0.025											
S. nip18	1.901	1.869	1.840	1.901	1.812	1.759	1.869	0.036	0.023	0.023										
S. nip22	0.025	0.030	0.028	0.025	0.043	0.043	0.035	1.966	1.812	1.812	1.870									
S. nip23	0.015	0.020	0.018	0.015	0.033	0.033	0.025	1.932	1.840	1.786	1.901	0.015								
S. nip25	0.025	0.030	0.033	0.025	0.048	0.043	0.041	2.000	1.900	1.841	1.966	0.036	0.025							
S. nip26	0.036	0.041	0.038	0.036	0.054	0.048	0.046	2.039	1.932	1.869	2.003	0.041	0.030	0.020						
S. nip27	0.018	0.017	0.015	0.023	0.030	0.030	0.022	1.900	1.812	1.761	1.870	0.028	0.018	0.033	0.033					
S. nip29	0.035	0.046	0.043	0.041	0.059	0.054	0.051	1.932	1.840	1.786	1.901	0.041	0.035	0.030	0.025	0.043				
S. nip30	0.023	0.023	0.025	0.002	0.041	0.035	0.033	1.932	1.840	1.786	1.901	0.028	0.018	0.028	0.038	0.025	0.043			
S. nip31	0.012	0.017	0.015	0.018	0.030	0.025	0.022	1.869	1.786	1.737	1.840	0.023	0.012	0.023	0.028	0.015	0.033	0.020		
S. nip32	0.017	0.023	0.025	0.023	0.041	0.040	0.033	2.000	1.900	1.841	1.966	0.030	0.017	0.033	0.043	0.025	0.049	0.025	0.020	

多样性情况,以之为参照,在今后定期对它们进行遗传多样性的监测,然后根据其变化趋势,采取相应有效措施,以维持现有合理的遗传多样性为前提,

科学地保护蓝点马鲛种质资源,以求其资源的可持续利用。

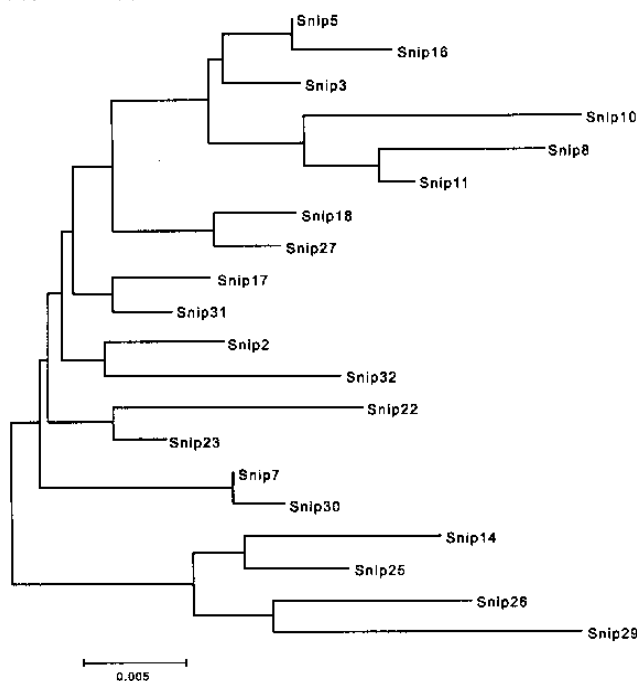


图3 由D-loop序列得到的NJ系统树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on D-loop sequences

本研究仅对采自山东半岛南岸水域生殖群体的样本进行了分析,有关结果尚不能全面地反映蓝点马鲛多个群体的遗传多样性水平与群体分化状态。此外,mtDNA不同区域的变异率存在差异,遗传变异解析能力也有所不同。在本研究中,D-loop序列的个体变异较大,使我们充分地检测到群体丰富的遗传多样性,这正是D-loop序列的优势和广泛用于群体水平研究的原因。当然,mtDNA其他基因也可用于群体水平(和种上水平)分析。同时,应该注意,由于存在于D-loop序列某些位点的多重(次)的替换,所检测的遗传多样性水平可能会略有偏高。对此,可选择mtDNA其他不同的基因(如CoI、Cytb等),进一步比较蓝点马鲛群体内及群体间的遗传多样性。更好的方法是把线粒体DNA序列数据与核基因组多样性数据(如AFLP、RAPD)结合起来,相互印证和补充,则能更客观、全面地揭示蓝点马鲛的遗传多样性水平及其群体分化状况。

参考文献:

- [1] 邓景耀,赵传缙. 海洋渔业生物学[M]. 北京:农业出版社,1991.
- [2] 陈大刚. 黄渤海渔业生态学[M]. 北京:海洋出版社,1991.
- [3] 邱盛尧,叶懋中. 黄渤海蓝点马鲛当年幼鱼的生长特性[J]. 水产学报,1993,17(1):14-23.
- [4] 邱盛尧,叶懋中. 黄渤海蓝点马鲛繁殖生物学研究[J]. 海洋与湖沼,1996,27(5):463-470.
- [5] 邱盛尧. 黄渤海蓝点马鲛 *Scomberomorus niphonius* (Cuvier et Valenciennes) 资源数[J]. 现代渔业资源,1995,10(3):16-19.
- [6] 黄克勤,熊国强. 东海蓝点马鲛种群鉴别研究[J]. 水产科技情报,1997,24(6):270-275.
- [7] 刘亚军,喻子牛,姜艳艳,等. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究[J]. 海洋与湖沼,2002,33(5):477-483.
- [8] 陈伟,李钰,陈宇,等. 中国北方汉族人 mtDNA D 环多态性研究[J]. 中华医学遗传学杂志,1999,16(4):246-248.
- [9] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1995:464-467.
- [10] Axel Meyer, Kocher D, Pereti Basasibwaki, et al. Monophyletic

- origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences[J]. Nature, 1990, 347(11): 550-553.
- [11] 权洁霞,戴继勋,沈颂东,等. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机多态 DNA 分析[J]. 海洋学报,2000,22(5):82-87.
- [12] 张四明. 中华鲟分子群体遗传学以及鲟形目若干种类的细胞和分子进化研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所, 1998.
- [13] 钱亚屏,褚嘉佑,初正韬,等. 应用线粒体 DNA D-LOOP 区遗传多样性分析云南 4 个少数民族的遗传关系[J]. 遗传学报,2001,28(4):291-300.
- [14] Quan Jiexia, Zhuang Zhimeng, Dai Jixun, et al. Genetic Diversity in *Liza haematocheila* Inferred from RAPD Analysis and Mitochondrial D-loop Sequences[J]. Biochem Gen, 2001.
- [15] 石拓,孔杰,刘萍,等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析—朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性[J]. 海洋与湖沼,1999,30(6):609-615.
- [16] 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 of *Scomberomorus niphonius* in the Yellow Sea revealed by mtDNA D-loop sequence

JIANG Yan-yan^{1,2}, KONG Xiao-yu¹, YU Zi-niu¹, ZHUANG Zhi-meng², JIN Xian-shi²

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The PCR technique was used to amplify the mtDNA D-loop in 20 individuals of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) collected from the Yellow Sea, along the southern coast waters of Shandong Peninsula. The PCR products were purified and sequenced. As a result, 410 bp nucleotide sequences of partial D-loop gene were obtained (the primer and some of the marginal sequences were excluded). By using Genedoc to align and compare the sequences of these 20 individuals with each other, 54 variation sites were observed, of which there were two deletions, one insertion, 43 transition sites, seven transversion sites and two transition-transversion sites. The pairwise genetic distances were computed by MEGA. The UPGMA and NJ phylogenetic trees were obtained through the cluster analysis over the pairwise genetic distance. As estimated by DNASP, the number of polymorphic sites (S) is 54; the nucleotide diversity (P_i) and the average number of nucleotide differences (K) are 0.027 1 and 11.047, respectively. It can be concluded that the variation in mtDNA D-loop of Spanish mackerel in the Yellow Sea is relatively rich. As a result, mtDNA D-loop can be one of the genetic markers available for scanning genetic diversity of intra-population and inter-populations.

Key words: *Scomberomorus niphonius*; mitochondrial DNA; D-loop; genetic diversity

Corresponding author: YU Zi-niu. E-mail: carlzyu@ouq.edu.cn