

基于 CO₁ 序列分析东海区四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)的种群遗传结构*

林少珍¹ 王丹丽² 王亚军² 严小军²

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325000; 2. 宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 采用 CO₁ 基因片段研究了东海区象山(XS)、乐清(YQ)和宁德(ND)三个四指马鲛群体的遗传多样性和种群遗传结构。在 90 个四指马鲛个体中, 共检出单倍型 13 个, 包括变异位点 23 个, 其中简约信息位点 14 个。在三个种群中, YQ 群体具有最高的单倍型多样性和核苷酸多样性水平, 但整体上, 三个群体的遗传变异水平均比较低。中性检验结果表明, 三个群体内部在分子水平可能存在自然选择作用。NJ 系统发生分析发现, YQ 部分单倍型与 XS 和 ND 群体聚在一起, 而与另一部分 YQ 群体遗传分化较大。AMOVA 分析显示, 遗传差异主要来自于群体内部(79.66%)。

关键词 四指马鲛, 细胞色素 *c* 氧化酶亚基 (CO₁), 种群结构, 遗传多样性

中图分类号 Q347

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum* Shaw), 隶属于马鲛目(Polynemiformes)、马鲛科(Polynemidae)、四指马鲛属(*Eleutheronema*), 俗名“午鱼”、“马友”等, 浙江一带俗称“障跳”。该鱼主要分布于印度洋和太平洋西部, 在我国沿海均有分布, 以南方分布较多。其肉质细嫩, 口味好, 为我国重要经济鱼类(毛连环, 2009)。目前, 国内外针对四指马鲛分类、繁育和渔业资源等方面虽已做了一些研究(Motomura, 2004; Motomura *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2011; Newman *et al.*, 2011; 毛连环, 2009), 但迄今为止有关我国海区四指马鲛资源的种群结构和遗传背景等方面的研究尚未见报道。鱼类种群遗传结构研究对鱼类资源保护和合理开发利用具有重要意义, 同时, 它还能指导渔业资源的管理和监测。对物种遗传结构缺乏了解往往容易导致地区的过度捕捞, 并最终导致物种的衰退(Shui *et al.*, 2009)。因此, 海洋物种的遗传多样性研究一直受到学者们的重视。

由于线粒体基因组(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, 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(徐梅英等, 2011)。其中, 细胞色素 *c* 氧化酶亚基 (cytochrome *c* oxidase subunit, CO₁) 序列进化速度较快, 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和种群遗传学研究中。例如, 冯建彬等(2008)利用 CO₁ 序列对我国五大淡水湖日本沼虾群体进行分析; 彭士明等(2010)利用线粒体控制区与 CO₁ 基因序列比较了养殖银鲳与野生银鲳群体的遗传差异。本研究通过对东海区四指马鲛群体的 CO₁ 序列片段进行扩增与测序分析, 比较了 3 个群体的遗传变异、遗传多样性和种群遗传结构, 以期对东海区四指马鲛资源的合理开发利用提供科学的参考依据, 并为未来其遗传育种与良种选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用四指马鲛样品共 90 尾, 所有样品均来自于东海海区, 包括象山(XS)群体、乐清(YQ)群体和

* 浙江省科技厅创新团队建设与人才培养项目, 2011F20033 号; 温州市重点科技创新团队项目, C20120004 号; 国家海洋局“海洋公益性行业科研专项”, 201105009-3 号。林少珍, E-mail: shaozhen8899@126.com

通讯作者: 王丹丽, 教授, wangdanli@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-02-25, 收修改稿日期: 2012-03-27

宁德(ND)群体各 30 尾。平均叉长为(19.8 ± 5.5)cm, 取其背部肌肉组织保存于-20℃保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取、CO I 基因片段扩增与测序

基因组 DNA 采用常规的酚-氯仿法进行提取(Sambrook *et al*, 1989)。扩增所用引物为 CO I a: AGT ATA AGC GTC TGG GTA GTC 和 CO I f: CCT GCA GGA GGA GGA GAY CC (Palumbi *et al*, 1991)。PCR 总反应体积为 50μl, 反应体系为: 1×PCR buffer、Mg²⁺ 终浓度为 1.5μmol/L、两端引物 0.3μmol/L、dNTPs 200mmol/L、模板 200ng、Taq 酶 3.5U (TaKaRa)。反应程序为: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s; 52℃退火 30s; 72℃延伸 45s, 共 30 个循环; 最后 72℃延伸 10min。

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 经 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海华舜)纯化, 送至上海桑尼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

测序结果采用 ClustalX 1.81(Thompson *et al*, 1997)进行比对, 并辅以人工校对。用 MEGA 4.0 (Tamura *et al*, 2007)分析不同序列的碱基组成、变异位点、核苷酸差异等, 计算个体间的遗传距离, 并采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)基于 Kimura 双参数模型构建单倍型系统树, 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 1000。采用 DNASP 4.0 (Rozas *et al*, 2003) 计算(haplotype diversity, *h*)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)、简约信息位点(parsimony informative sites)数。采用 Arlequin 3.01 (Excoffier *et al*, 2005)中的 AMOVA 分析、Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 中性检验评估四指马鲛群体的种群结构与种群动态。

2 结果

2.1 序列变异与单倍型分布

对 3 个四指马鲛群体 CO I 基因片段进行测序, 经过人工校正和序列比对, 共获得 60 条长度为 627bp 的四指马鲛 CO I 基因同源序列。60 条序列定义了 13 个单倍型, 监测到变异位点 23 个, 发生 24 次点突变; 其中包含简约信息位点(Parsimony informative sites) 14 个, 单一位点(Singleton variable sites)9 个(表 1), 没有出现碱基的插入/缺失。

在 XS、YQ 和 ND 三个群体中, 分别发现单倍型 5、11 和 5 个(表 2)。其中, XS 和 YQ 群体共享单倍型 4 个; XS 和 ND 群体共享单倍型 3 个; YQ 和 ND 群体共享单倍型 4 个; 有 3 个单倍型为三个群体共享。3 个群体中, YQ 群体的单倍型多样性最高(0.7816), 而其它两个群体中均呈现较低水平。此外, YQ 群体的核苷酸多样性也最高(0.00556), 其它两群体中则水平较低。3 个群体的遗传距离为 0.002—0.009(表 3), 远远低于物种之间的分化程度, 因此尚未构成亚种的分化。

表 1 四指马鲛 3 个群体 CO I 基因片段变异位点
Tab.1 Variable sites of CO I gene segment sequences in three populations of *E. tetradactylum*

核苷酸多态位点	12334 44455 55555 55555 566	群体单倍型数总计		
	96123 48922 33445 59999 902 81187 70226 47094 50147 920	XS	YQ	ND
Hap_1	ACCGC AGGGG GGAGC AAGTG AGG	21	20	1
Hap_2	..T..	2	1	1
Hap_3 G.... ..G..	4	4	1
Hap_4 G....	1	0	0
Hap_5	G.... G....	2	0	1
Hap_6	.T... G..	0	3	0
Hap_7 G.A..	0	2	1
Hap_8	...T.A CC.T. .GCG. .TA	0	0	1
Hap_9	G..TG GT... T.... ..C .T.	0	0	8
Hap_10G G....	0	0	2
Hap_11 G....	0	0	12
Hap_12	G..TG GT..A T.... ..C .TA	0	0	1
Hap_13G G..AA CC..G CGCGC GTA	0	0	1

注: “.”表示与第一行序列碱基相同

表 2 四指马鲛 3 个群体的遗传多样性参数
Tab.2 Parameter of genetic diversity in three populations of *E. tetradactylum*

群体	象山(XS)	乐清(YQ)	宁德(ND)
样品数	30	30	30
片段长度(bp)	627	627	627
多态位点数(S)	4	21	4
单倍型数(H)	5	11	5
单倍型多样性(Hd)	0.4989±0.1030	0.7816±0.0591	0.5402±0.0990
核苷酸多态性(π)	0.00090±0.00084	0.00556±0.00325	0.00139±0.00112
平均碱基配对差异(K)	0.56322±0.47235	3.48736±1.82866	0.86890±0.62878
Fu's 和 $F_S D$ 检验	-2.16519*	-1.6557	-0.99888
Tajima's D 检验	-1.13535	-1.19804	-0.35783

注: *表示有显著性差异($P < 0.05$)

表 3 四指马鲛 3 个群体的遗传距离
Tab.3 Genetic distance between three populations of *E. tetradactylum*

群体	象山(XS)	乐清(YQ)	宁德(ND)
象山(XS)	—		
乐清(YQ)	0.008	—	
宁德(ND)	0.002	0.009	—

2.2 种群遗传结构

采用邻接法基于双参数模型构建 3 个群体的单倍型系统发生树(图 1)。结果表明, 3 个群体的单倍型可以分为两支, 其中一支由 3 个群体存在的共享单倍型组成, 而另一支由 YQ 群体中的单倍型构成。AMOVA 分析结果如表 4 所示, 79.66% 的遗传变异来源于群体内部, 而 20.34% 的变异来自于群体之间。Tajima's D 和 Fu's F_S 中性检验结果如表 2 所示。3 个群体的检验值均为负值, 而 XS 群体的 Fu's F_S 检验结果为显著性负值, 表明 XS 群体经历过种群扩张现象。

3 讨论

3.1 东海区 3 个四指马鲛群体的遗传多样性

遗传多样性是形成生物多样性的基础, 也是物种进化潜能的保证。一般而言, 物种遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件, 遗传多样性下降, 会直接导致物种对环境适应能力的下降(Conrad, 1983; Feral, 2002; Frankham *et al.*, 2002)。四指马鲛因其肉质鲜美而深受消费者的喜爱, 为我国重要的经济鱼类之一。目前其人工繁殖相关研究已有进展, 然而, 尚未见有关其种群遗传和资源多样性方面的报道。本研究通过线粒体 CO 基因片段研究了

东海区四指马鲛群体的种群结构与遗传多样性, 揭示了其资源现状, 可为其资源合理开发与种子资源保护提供信息支持。

研究表明, 四指马鲛 3 个东海群体均有较丰富的单倍型多样性(h)。核苷酸多样性(π)是表示每个群体

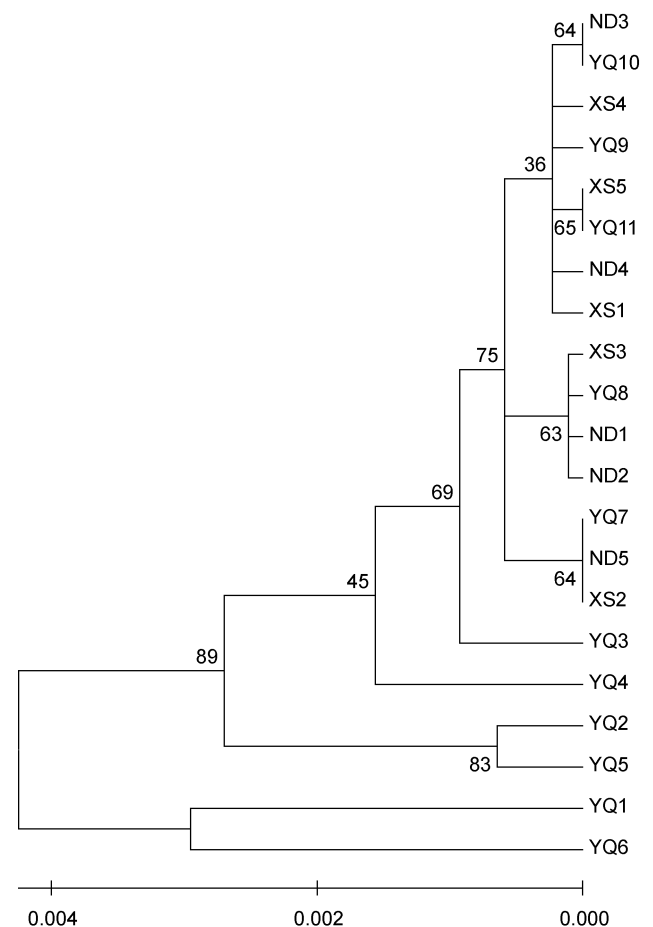


图 1 基于 CO 序列的四指马鲛系统发生 NJ 树
Fig.1 Neighbour-Joining tree of *E. tetradactylum* based on CO I sequences

表4 四指马鲛3个群体的 AMOVA 分析
Tab.4 AMOVA analysis of three populations of *E. tetradactylum*

变异来源	自由度 <i>df</i>	方差总和 (SSD)	变异组分 (<i>V_a</i>)	变异贡献率 (%)
群体间	2	11.800	0.20934	20.34
群体内	87	71.333	0.81992	79.66
总计	89	83.133	1.02926	100

内各个单倍型的两两配对差异的平均值, 是一个重要的群体遗传多样性指标。在3个东海群体中, YQ 群体的单倍型多样性和核苷酸多样性水平均为最高 ($h=0.7816$, $\pi=0.00556$), 而其它2个群体中 h 和 π 均处于较低的水平。由于近年来的过度捕捞和环境污染, 东海区的鲳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了改变, 渔获年龄、组成和数量等都急剧下降(樊伟等, 2003; 王凯等, 2007; 凌建忠等, 2008; 程炎宏等, 2003)。推测四指马鲛2个群体的遗传多样性水平偏低, 可能是由于巨大的捕捞压力和水环境的恶化, 导致其资源量下降, 进而有效群体的数量下降, 出现瓶颈效应, 这种状况不利于东海区四指马鲛资源的可持续性利用。因此, 必须加强对现有资源的科学管理和保护, 降低捕捞强度, 恢复有效种群大小, 以避免种群资源的进一步恶化和衰退; 同时, 对 YQ 群体也要进行必要的管理和监督, 以保证其种群的长期稳定和可持续开发利用。

3.2 东海区3个四指马鲛群体的种群遗传结构

分析表明, 3个东海群体的平均遗传距离为0.002—0.009, 小于物种间的分化程度(10%), 表明3个群体尚未构成亚种的分化(Billington *et al*, 1991)。在3个群体中, XS 和 ND 两个群体间的遗传距离较小, 与 YQ 群体中部分单倍型之间的变异也较小, 与 YQ 群体中的其它5个单倍型之间的遗传变异程度却较大, 表明 YQ 群体较大而稳定, 并有可能与其它群体之间存在基因流。NJ 系统发生结果显示, 东海区3个四指马鲛群体之间存在多个共享单倍型, 且3个群体单倍型聚集在一起, 而与 YQ 群体的其余部分单倍型差异较大。AMOVA 分析表明, 群体间的遗传变异程度较低, 而群体内的变异高达79.66%, 表明3个四指马鲛群体没有形成相互隔离的遗传结构。总体上, 3个群体间遗传差异较小, 推测这与四指马鲛群体的高度分散能力有关(杨频等, 2007)。

Fu's F_S 中性检验能有效地检测种群动态, 通常情况下 F_S 值对种群扩张现象较为敏感, 当有种群扩

张现象出现时, 其将呈现出显著性的负值; 在本研究中发现, 3个群体的 F_S 值均为负数, 而 XS 群体的呈显著性负值, 表明其出现过种群扩张现象, 种群内部均受到较强的选择作用。Grant 等(1998)根据单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(P_i)两者的关系将种群事件分为4种模式: 第一类为 h 和 P_i 均低($h<0.5$, $P_i<0.005$), 第二类为 h 高而 P_i 低, 第三类为 h 低而 P_i 高, 第四类为 h 和 P_i 均高。本研究中 XS 和 ND 群体即属于第一类情况, 其单倍型和核苷酸变异的多样性水平均较低, 表明其最近出现过种群瓶颈效应或种群由单一、少数系群所发生的创立者效应(founder effect)形成; 而 YQ 群体属于第四种情况, 表明该群体是具有长期进化历史的大而稳定的群体构成, 或者由遗传差异较大的不同群体接触形成。

然而, 考虑到本次研究中取样种群数量和利用单个基因评估四指马鲛不同群体的遗传多样性和种群遗传结构的局限性, 今后还应该进一步扩大取样范围, 并综合包括线粒体和细胞核上的多种分子标记的数据, 以期对东海及其它各海区四指马鲛种群资源进行更全面、客观的结论。

参 考 文 献

- 王 凯, 严利平, 程家骅等, 2007. 东海鲳鱼资源合理利用的研究. 海洋渔业, 29(4): 337—343
- 毛连环, 2009. 四指马鲛人工繁殖技术. 水产科技情报, 36(6): 275—278
- 冯建彬, 孙悦娜, 程照等, 2008. 我国五大淡水湖日本沼虾线粒体 CO 基因部分片段序列比较. 水产学报, 32(4): 517—525
- 杨 频, 张 浩, 陈立侨等, 2007. 利用 CO 基因序列分析长江与澜沧江水系日本沼虾群体的遗传结构. 动物学研究, 28(2): 113—118
- 徐梅英, 李继姬, 郭宝英等, 2011. 基于线粒体 DNA 12S 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. 海洋与湖沼, 42(3): 387—396
- 凌建忠, 李圣发, 严利平等, 2008. 基于 Beverton-Holt 模型的东海带鱼资源利用与管理. 应用生态学报, 19(1): 178—182
- 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利, 2010. 基于线粒体 D-loop 区与 CO 基因序列比较分析养殖与野生银鲳种群遗传多样性. 水产学报, 34(1): 19—25
- 程炎宏, 樊 伟, 2003. 东海区海洋捕捞产量的时间序列分析研究. 中国水产科学, 8(3): 31—34
- 樊 伟, 周胜芳, 崔雪深等, 2003. 拖网捕捞对东海渔业资源种群结构的影响. 应用生态学报, 14(10): 1697—1700
- Billington N, Hebert P D N, 1991. Mitochondrial DNA diversity

- in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aqua Sci*, 48(suppl): 80—94
- Conrad M, 1983. *Adaptability: the Significance of Variability from Molecular to Ecosystem*. New York: Plenum Press, 279—281
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bio*, 1: 47—50
- Feral J P, 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. *J Exp Mar Bio Ecol*, 268: 121—145
- Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A, 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 25—27
- Grant W S, Bowen B W, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insight from Sardines and Anchovies and lessons for conservation. *J Hered*, 89(5): 415—426
- Moore B R, Stapley J, Allsop Q *et al*, 2011. Stock structure of blue threadfin *Eleutheronema tetradactylum* across northern Australia, as indicated by parasites. *J Fish Biol*, 78: 923—936
- Motomura H, 2004. *Threadfins of the World (Family Polynemiidae)*. An annotated and illustrated catalogue of Polynemid Species known to date. FAO, Rome, 3—10
- Motomura H, Iwatsuki Y, Kimura S *et al*, 2002. Revision of the Indo-West Pacific polynemid fish genus *Eleutheronema* (Teleostei: Perciformes). *Ichthyol Res*, 49: 47—61
- Newman S J, Pember M B, Rome B M *et al*, 2011. Stock structure of blue threadfin *Eleutheronema tetradactylum* across northern Australia as inferred from stable isotopes in sagittal otolith carbonate. *Fish Man Ecol*, 18: 246—257
- Palumbi S R, Kwasing B, 1991. Population biology of the Trans-arctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins. *Evolution*, 45: 1790—1805
- Rozas J, Sanche-DelBarrio J C, Messenguer X *et al*, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496—2497
- Sambrook J, Fritsch E P, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold spring Harbor laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 81—85
- Shui B N, Han Z Q, Gao T X *et al*, 2009. Mitochondrial DNA variation in the East China Sea and Yellow Sea populations of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*. *Fish Sci*, 79: 593—600
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Bio Evol*, 24: 1596—1597
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucle Acids Res*, 25: 4876—4882

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF *ELEUTHERONEMA TETRACTYLUM* (SHAW) IN EAST CHINA SEA BASED ON SEQUENCE ANALYSIS OF CO GENE

LIN Shao-Zhen¹, WANG Dan-Li², WANG Ya-Jun², YAN Xiao-Jun²

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou, 325000; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract Population genetic structure and genetic diversity of *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw) in East China Sea were evaluated by mitochondrial CO partial sequences. A total of 90 individuals were analyzed, and 23 polymorphic sites (including 14 parsimony informative sites) defined 13 distinct haplotypes. Yueqing (YQ) population had the highest values of both haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π), but the levels of h and π were generally low in all three populations. Neutral evolution test and mismatch distribution indicated historical demographic expansion happened in three populations. NJ phylogenetic tree indicated that haplotypes from XS (Xiangshan population), ND (Ningde population) and part of YQ population pooled together, which had high genetic divergence from other haplotypes in YQ population. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that variations were mainly within population (79.66%). The present results provide new information for genetic assessment, fishery management and conservation of this species.

Key words *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw), Cytochrome *c* oxidase subunit (CO), Population structure, Genetic diversity