

黄海带鱼、小带鱼 RAPD 和线粒体 16S rRNA 基因序列变异分析*

蒙子宁^{1,2} 庄志猛^{1**} 金显仕¹ 唐启升¹ 苏永全²

1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 黄海水产研究所, 青岛 266071;

2. 厦门大学海洋系, 厦门 361005

摘要 对黄海带鱼、小带鱼各 12 个个体进行随机扩增多态 DNA(RAPD)分析, 对比多态位点比例、遗传多态度以及遗传距离, 并构建 Neighbor-joining 系统树; 通过 PCR 扩增出线粒体 16SrRNA 基因, 纯化后直接测序, 利用生物信息学方法进行序列分析和核苷酸变异比较, 结合 GenBank 上大西洋叉尾带鱼同源序列构建 UPGMA 系统树. 分析结果表明: (1) RAPD 技术研究黄海带鱼和小带鱼的遗传多样性具有较高的灵敏度和检出率, 带鱼的多态比例和遗传多态度均较小带鱼的低; (2) 线粒体 16S rRNA 基因序列在分析这两物种遗传变异时表现出保守和变异的双重特性, 种内变异极小而种间较大; (3) 5 个随机引物扩增出种特异的 RAPD 带, 可作为种间分子鉴定标记; (4) 研究证实带鱼和小带鱼是不同属的两个种, 从而在基因水平上支持了 Nelson 分类系统的观点.

关键词 带鱼 小带鱼 RAPD 线粒体 16S rRNA 序列变异

带鱼 (*Trichiurus lepturus* Linnaeus 1785), 俗称刀鱼、白带鱼和鳞刀鱼, 为广泛分布于我国、朝鲜、日本、印度尼西亚、菲律宾、印度、非洲东岸及红海等海域的暖水性底层鱼类. 分布于我国诸海区的带鱼有 3 个种群, 分别为黄渤海群、东海群和南海群, 为我国最重要的海洋渔业捕捞对象之一, 最高年产量达 50 余万吨, 居我国海洋渔业单鱼种渔获量首位, 约占世界同种鱼渔获量的 70%^[1]. 自 20 世纪 70 年代以来, 由于多年持续捕捞过度, 带鱼资源严重衰退, 东海种群的个体小型化、低龄化和早熟现象明显; 南海带鱼渔场日益萎缩, 汛期趋短; 黄渤海种群自 1964 年大幅度下降后, 资源每况愈下, 进入 80 年代后, 渔汛不复存在, 沦为兼捕对象^[2, 3].

现代遗传学观点认为, 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, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件^[4]. 因此, 研究物种的遗传结构和遗传分化, 揭

示其遗传多样性水平是生物资源恢复和持续利用的前提和基础. 有关带鱼的研究大多集中在渔业生物学方面, 涉及遗传背景的研究很少^[5, 6]. 本研究采用随机扩增多态 DNA(RAPD)及线粒体 16S rRNA 基因序列分析两种技术研究带鱼的遗传多样性, 并与我国近海的另一种体型酷似带鱼、生境也近似的带鱼科 (*Trichiuridae*) 习见种类—小带鱼 (*Eupleurogrammus muticus* Gray 1830) 的遗传结构进行对比分析, 从 DNA 变异水平上探讨了两物种的分类地位, 以期对带鱼资源保护和管理提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

带鱼样品 (20 个个体, 平均肛长 157.2 mm) 和小带鱼样品 (17 个个体, 平均肛长 107.5 mm) 系 2002 年 8 月执行黄海资源监测调查时采自山东荣成外海, 在 -20℃ 冰库内保存, 运回实验室后转入

2003-03-07 收稿, 2003-05-28 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划资助项目 (批准号: G19990437)

** 联系人, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

-80℃超低温冰柜备用。

1.2 DNA提取

从所采集的样品中随机选取带鱼、小带鱼各12尾用于本研究,基因组DNA提取参照文献[7]的方法进行。

1.3 RAPD的PCR扩增及电泳

PCR反应总体积为25 μL,包括50 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-Cl, pH 9.0, 1% TritonX-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L引物(上海生工,见表1), 1U Taq DNA聚合酶(Promega Biotec)以及20 ng基因组DNA。反应在PE9600扩增仪上经95℃预变性5 min后经过45个循环,每个循环包括94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min,最后于72℃延伸10 min。RAPD产物用含有溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,于Gel Doc 1000(Bio-RAD)自动成像仪上观察并打印出电泳图谱。

表1 随机引物序号及序列

引物	序列(5'→3')	引物	序列(5'→3')
S103	AGACGTCCAC	S120	GGGAGACATC
S104	GGAAGTCGCC	S121	ACGGATCCTG
S105	AGTCGTCCCC	S122	GAGGATCCCT
S108	GAAACACCCC	S123	CCTGATCACC
S109	TGTAGCTGGG	S124	GGTGATCAGG
S112	ACGCGCATGT	S125	CCGAATTCCC
S113	GACGCCACAC	S127	CCGATATCCC
S114	ACCAGGTTGG	S128	GGGATATCGG
S115	AATGGCGCAG	S129	CCAAGCTTCC
S116	TCTCAGCTGG	S130	GGAAGCTTGG
S117	CACTCTCCTC	S132	ACGGTACCAG
S118	GAATCGGCCA	S133	GGCTGCAGAA
S119	CTGACCAGCC	S135	CCAGTACTCC

1.4 线粒体16S rRNA基因片段扩增及测序

所用引物序列¹⁾为16SAR: 5'~GCCTGTT-TATCAAAAACAT~3'; 16SBR: 5'~CCGGTCT-GAACTCAGATCACGT~3'(上海生工合成)。PCR反应总体积为25 μL,包括2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L每种引物, 1U Taq plus DNA聚合酶(上海生工), 1×Taq聚合酶缓冲液以及30 ng基因组DNA。反应条件为94℃预变性2 min后经过30个循环,每个循环包括94℃ 45 s,

50℃ 1 min, 72℃ 1 min,最后72℃延伸10 min。PCR产物用UNIQ-5(上海生工)柱式纯化试剂盒纯化后,在ABI310型自动测序仪(Perkin Elmers)上进行测序。

1.5 数据分析

1.5.1 RAPD 电泳图谱中的每一条带记为一个位点,只记录那些电泳后可辨认的条带,当某一扩增带出现时记为1,缺失则记为0,从而建立原始谱带矩阵,并据此统计位点总数、多态位点数和多态位点比例。

Shannon表型多样性指数量化遗传多态度的计算公式为:

$$H = - \sum X_i \ln X_i,$$

(X_i为位点i在某一群体中的出现频率)。

利用POPGENE1.32软件计算种间遗传距离和遗传相似度^[8],用RAPDist软件构建Neighbor-joining(NJ)系统树。

1.5.2 线粒体16S rRNA 从GenBank取得大西洋叉尾带鱼(*Lepidopus caudatus* Euphrasen 1788)的线粒体16SrRNA基因(登录号:AF100917, AF100918)相应片段作为参考序列,用Genedoc软件对所测序列以及参考序列进行对位排序,并结合人工校正。通过MEGA2软件统计序列的碱基组成,根据Kimura's 2-parameter模型计算种内和种间的遗传距离,并构建Unweighted pair group method of arithmetic means(UPGMA)系统树,采用Bootstrap 2000检验分子系统树各分枝的置信度。用DNASP软件计算多态位点、核苷酸多样性、平均核苷酸差异数以及群体间平均每位点核苷酸替代数。

2 结果

2.1 RAPD

26个随机引物在两物种24个个体中共扩增出167个位点,呈多态的有122个(73.05%)。除5个引物(S104, S115, S118, S127, S128)为单态外,其余21个引物分别扩增出1~11个多态位点。带鱼12个个体中存在61个多态位点,多态位点比

1) Kessing B, et al. The Simple Fool's Guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, 1989, 23

例为 36.53%；小带鱼则在 85 个位点上呈多态，多态位点比例达 50.90%。另外，5 个引物 (S108, S117, S123, S124, S129) 扩增出种特异的 RAPD

条带。图 1 例举了引物 S127(单态)及 S117(种特异)对所有个体扩增产物的电泳图谱。

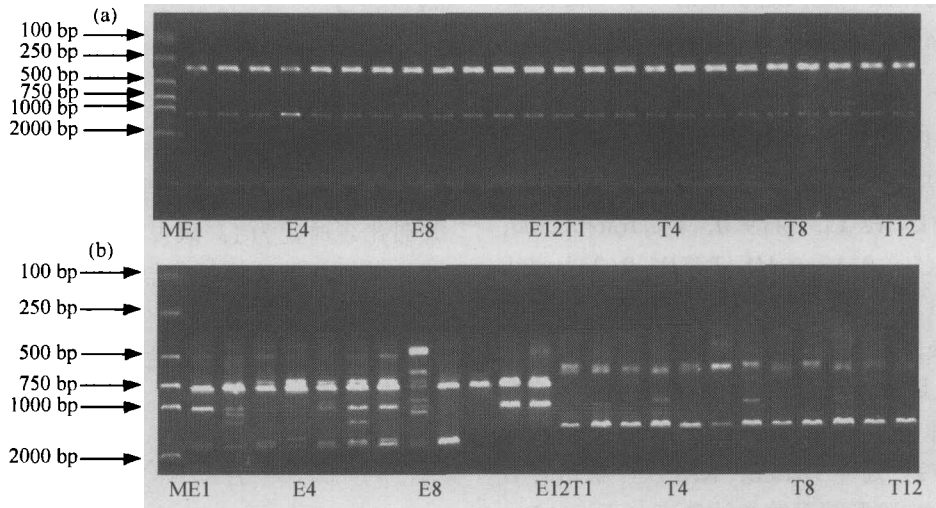


图 1 引物 S127, S117 对带鱼(T1~12), 小带鱼(E1~12)的 RAPD 电泳图谱. M, DL2000 分子量标志

(a) 为单态图谱, 两条扩增带(分子量约 350, 1100 bp)为带鱼和小带鱼所有个体共有;
 (b) 为种特异图谱, 带鱼特异带分子量约为 1500 bp, 小带鱼特异带分子量约为 750 bp

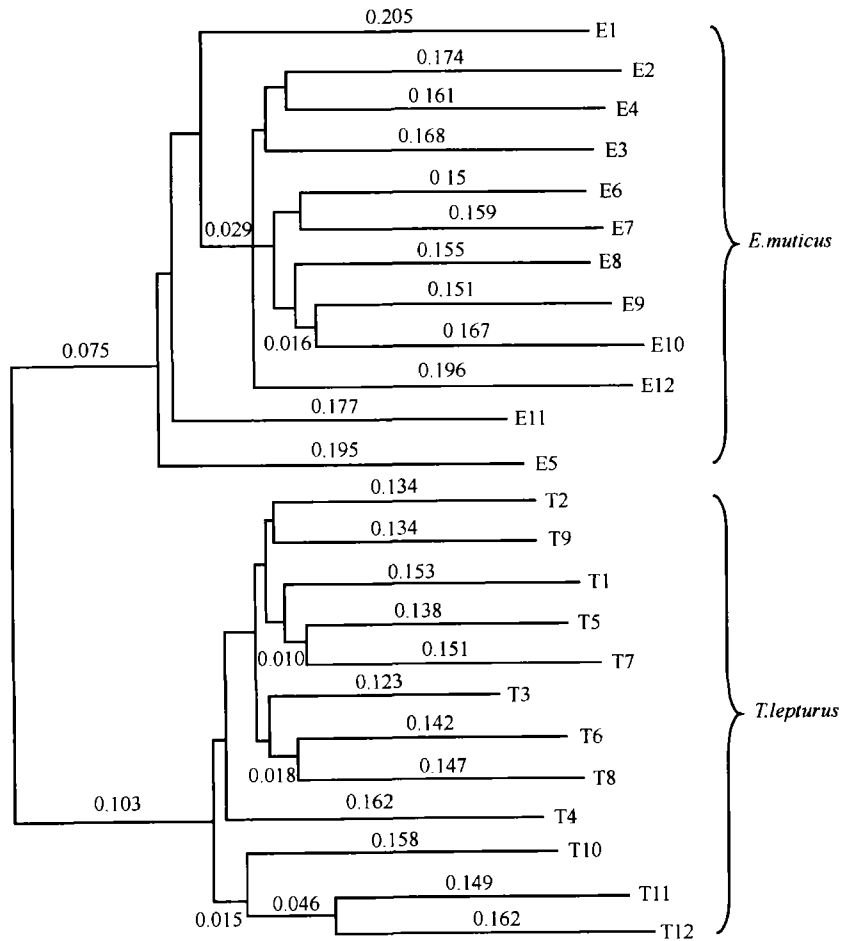


图 2 带鱼(*T. lepturus*, T1~T12), 小带鱼(*E. muticus*, E1~E12)个体间 NJ 系统树

Shannon 表型多样性指数显示带鱼的遗传多态度(0.1575)要小于小带鱼(0.2565); 根据 Nei 方法得出带鱼和小带鱼种间存在较大的遗传距离为 0.3003, 遗传相似度仅为 0.7406; Neighbor-joining 系统树形成两主枝, 两个物种的个体分别聚类, 各占一枝(图 2).

2.2 线粒体 16S rRNA

经 PCR 扩增, 分别得到了带鱼和小带鱼清晰的 16S rRNA 基因片段扩增产物(图 3), 经测定得到序列约 500bp(不含引物)(图 4), 已在 GenBank 数据

库登录 (AY216492~AY216494(带鱼), AY212325(小带鱼)). 带鱼和小带鱼之间共存在 88 个变异位点, 其中 12 个为插入/缺失, 其余 76 个为转换/颠换, 转换/颠换之比为 1.9, 能提供简约性信息的位点 75 个, 单个突变位点 1 个. 带鱼 12 个个体的序列显示有 3 个不同的单倍型, 单倍型 I 分布频率为 83.3%(10 个个体), 单倍型 II 和 III 各自出现在一个个体中(T4 和 T8), 是单倍型 I 分别发生了一次 (G→A)和(C→T)转换后形成的; 小带鱼所有个体的序列完全相同, 共享一个单倍型.

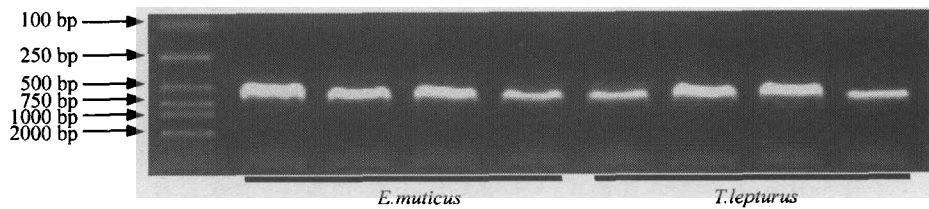


图 3 带鱼 (*T. lepturus*) 和小带鱼 (*E. muticus*) 线粒体 16S rRNA 基因片段扩增产物

带鱼的 T, C, A, G 4 种碱基的平均含量分别为 21.1%, 28.0%, 29.0%, 21.9%, A + T 含量接近 50%, 这与小带鱼以及作为参考的大西洋叉尾带鱼的碱基组成近似(表 2). 根据 Kimura 双参数模型得出 3 种带鱼种内遗传距离很小(0~0.002), 种间较大(0.124~0.175). 进一步进行序列核苷酸差异比较, 带鱼、小带鱼和大西洋叉尾带鱼种内只有 0~2 个核苷酸变异, 平均核苷酸差异数(0~1)和核苷酸多样性(0~0.00203)均非常低; 而种间却存在较大的变异, 平均核苷酸差异数高达 55.4~77.5,

平均每位点发生 0.11356~0.15752 个核苷酸替代. 显然, 通过遗传距离和序列核苷酸差异的比较可得出结论: 3 种带鱼种内无明显的遗传差异, 而种间存在较大的遗传分化.

图 5 为聚类分析得到的 UPGMA 系统树. 带鱼、小带鱼、大西洋叉尾带鱼均以极高的置信度(99%)各自聚类, 反映出种间明显的遗传分化. 带鱼与大西洋叉尾带鱼首先聚在一起, 然后再与小带鱼聚类.

表 2 带鱼(T), 小带鱼(E)和大西洋叉尾带鱼(L)线粒体 16S rRNA 基因的碱基组成及遗传信息指数

物种	碱基组成					遗传距离	多态位点数	平均核苷酸差异数	核苷酸多样性	平均每位点核苷酸替代数	
	T	C	A	G	A+T						
种内	T	21.1	28.0	29.0	21.9	50.1	0.001	2	0.3	0.00068	—
	E	24.8	23.6	29.9	21.8	54.7	0	0	0	0	—
	L	23.2	24.6	29.7	22.4	52.8	0.002	1	1	0.00203	—
种间	T-E	—					0.175	76	75.0	—	0.15275
	T-L	—					0.124	56	55.4	—	0.11356
	E-L	—					0.173	78	77.5	—	0.15752

3 讨论

我们用 26 个随机引物在两个物种中共扩增出 167 个位点, 其中 122 个(73.05%)呈多态. 可见, 用 RAPD 技术研究黄海带鱼和小带鱼的遗传多样性具有较高的灵敏度和检出率. 带鱼的多态比例和遗

传多态度均较小带鱼的低, 除了物种差异外, 由于对它们的遗传背景知之甚少, 尚难究其原因. 但值得指出的是, 在 20 世纪 60 年代之前, 黄海带鱼是我国北方的重要渔业对象, 最高年产量达 6.6 万吨(1960 年), 过度捕捞, 已导致黄海带鱼资源严重破坏, 该种群承受着巨大的捕捞压力, 定向选择加强

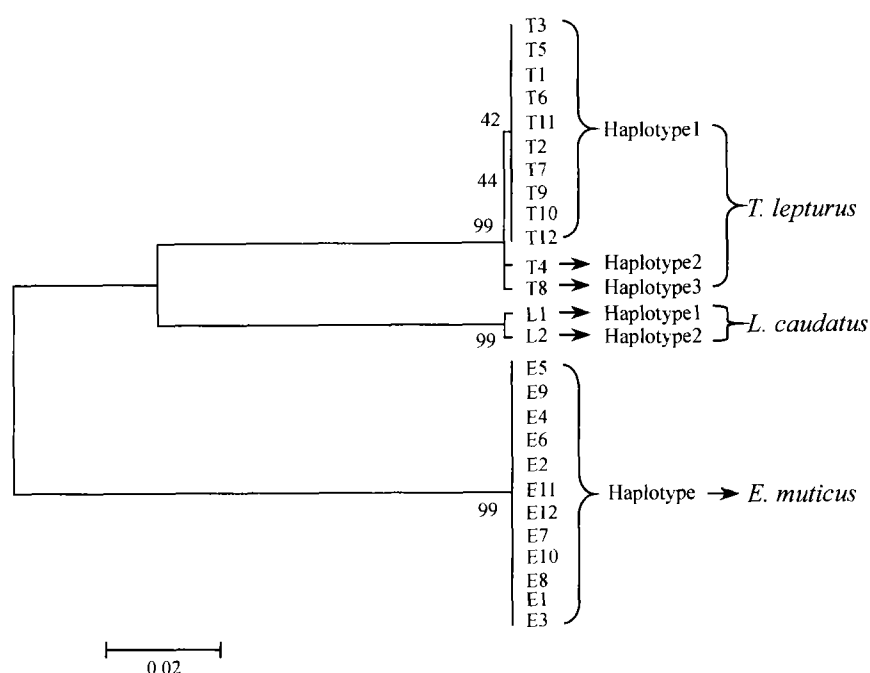


图5 基于带鱼、小带鱼和大西洋叉尾带鱼线粒体 16S rRNA 基因的 UPGMA 系统
树枝上数值为 2000 次 bootstrap 后的置信度

势必影响该种群的遗传结构。线粒体 16S rRNA 基因进化速度慢，常用于种以上水平的检测^[9]。本研究只从带鱼检测到 2 个核苷酸变异，所检测的小带鱼所有个体序列竟完全相同，两物种间的变异位点却高达 88 个，这充分体现了此基因保守和变异的双重特性。保守性反映生物的亲缘关系，变异性则是不同物种内在遗传分化的写照，也是鉴定属种的分子

基础。就碱基组成而言，带鱼、小带鱼与大西洋叉尾带鱼相似，同时与其他鱼类接近^[10~12](表 3)，这不仅说明本实验所得到的序列不是核 DNA 中的假基因，也反映了一般鱼类 16S rRNA 基因的碱基组成特点，约 50% 的 A + T 含量相比于其他物种(爬行动物: Colubrine 蛇 61%^[13], 甲壳动物: 对虾 65.6%¹⁾, 卤虫 62%^[14], 昆虫: 果蝇 78%^[15])是比较低的。

表 3 几种类别线粒体 16S rRNA 基因片段的碱基组成

种 名	碱基组成/%				
	T	C	A	G	A+T
带鱼(<i>T. lepturus</i>)	21.1	28.0	29.0	21.9	50.1
小带鱼(<i>E. muticus</i>)	24.8	23.6	29.9	21.8	54.7
大西洋叉尾带鱼(<i>L. caudatus</i>)	23.2	24.6	29.7	22.4	52.8
南美水虎鱼(<i>Characidue</i>)	21	23	31	24	52
牙鲆、川鲽、石鲽(<i>P. olivaceus</i> , <i>P. flesuus</i> , <i>K. bicoloratus</i>)	21.7	26.2	28.8	23.3	50.5
红鲤、散鲤、镜鲤(<i>Cyprinus carpio</i> L. Var.)	21	24	32	23	53

鱼类种类鉴定是渔业生物学和种群遗传学研究的基础，大多数海洋鱼类种的鉴定主要依靠成鱼的特征。带鱼和小带鱼形态上非常相似，加上它们生境相似，经常混栖于相同水域，体型很小的仔稚鱼就更难辨认，给进一步研究它们的早期生活史及其补充动态造成了很大的困难，不利于资源的保护和

管理。分子标记由于反映的是物种内在遗传差异，不受发育时段的影响，故已成为鉴定海洋鱼类鱼卵和仔稚鱼的有力工具^[16~18]。本研究中由 26 个随机引物扩增结果构建的 NJ 系统树准确的将带鱼和小带鱼所有个体分别聚类开来。共有 5 个随机引物(S108, S117, S123, S124, S129)扩增出种特异的

1) 权洁霞. 梭鱼和中国对虾的遗传多样性以及对虾总科十二种虾的分子系统进化. 青岛海洋大学博士论文, 2000

RAPD 条带, 如引物 S117(图 1(b)), 带鱼的特异带分子量约为 1500 bp, 而 750 bp 的扩增带为小带鱼所独有. 这些种特异带可以作为分子鉴定标记简便而快速的区分带鱼和小带鱼仔稚鱼. 另一方面, 线粒体 16S rRNA 基因序列显示带鱼和小带鱼较大的核苷酸差异, 能提供简约信息的变异位点就有 75 个, UPGMA 系统树更是以 99% 的置信度将带鱼和小带鱼区分开. 因此, 考虑到 DNA 序列的比较能最直接的揭示遗传变异, 若实际需要精确鉴别这两个物种的仔稚鱼, 线粒体 16S rRNA 基因序列比较将是合适的研究手段.

关于带鱼和小带鱼的分类地位曾一度存在争议, 采用不同的分类系统其分类地位也不尽相同. 我国过去很长一段时期惯用的 Berg 和 Rass 分类系统把它们归于同一个属^[19, 20], 而目前世界采用的 Nelson 系统则认为它们是不同属的两个种^[21]. 利用 RAPD 和线粒体 16S rRNA 序列分析这两种分子生物学技术检测基因组 DNA 和线粒体 DNA 的变异, 研究发现两物种之间存在丰富的变异位点和较大的遗传距离. 为了更清楚的揭示其亲缘关系, 我们从 GenBank 引进了带鱼科不同属的大西洋叉尾带鱼相应的基因片段进行对比, 带鱼与大西洋叉尾带鱼的遗传距离 (0.124) 要小于与小带鱼的遗传距离 (0.175). 此外, UPGMA 系统树中带鱼与大西洋叉尾带鱼最先聚类, 然后再与小带鱼聚. 显然, 带鱼与不同属的大西洋叉尾带鱼有着更近的亲缘关系, 与小带鱼之间应是属水平上的差异. 因此, 本研究结果从基因水平上支持纳尔逊分类系统的观点, 即带鱼和小带鱼是不同属的两个种.

参 考 文 献

- 林福申. 带鱼. 海洋信息, 1991. 4: 18
- 邓景耀, 等. 海洋渔业生物学. 北京: 农业出版社, 1991. 111~163
- 刘效舜, 等. 黄渤海区渔业资源调查与区划. 北京: 海洋出版社, 1990. 218~225
- Conrad M. Adaptability: The Significance of Variability from Molecular to Ecosystem. New York: Plenum Press, 1983
- 王可玲, 等. 中国近海带鱼种生化遗传结构及其鉴别的研究. 海洋学报, 1994, 16 (1): 93
- 王可玲, 等. 南海带鱼遗传变异及其分类的研究. 海洋科学, 1992, 2: 69
- Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89: 583
- Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNAs. In: Evolution of Genes and Proteins. Sunderland: Sinauer, 1983, 62
- Guillermo Orti, et al. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. J Mol Evol, 1996, 42: 169
- 孔晓瑜, 等. 牙鲆、石鲈和川鲈的线粒体 16S rRNA 基因片段的序列比较研究. 青岛海洋大学学报, 2001, 31 (5): 713
- 童金苟, 等. 三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性. 水生生物学报, 2001, 25 (1): 53
- Lopez T J, et al. Mitochondrial DNA sequence variation and genetic differentiation among colubrine snakes (Reptilia: Colubridae: Colubrinae). Biochem Systemat Ecol, 1995, 23 (5): 487
- Palmero I, et al. Isolation of cDNA clones coding for mitochondrial 16S ribosomal RNA from crustacean *Artemia*. Gene, 1988, 68: 239
- Clary D O, et al. The ribosomal RNA genes of *Drosophila* mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res, 1985, 13 (1): 4029
- Mork J, et al. Identification of marine fish eggs: A biochemical genetics approach. Can J Fish Aquat Sci, 1983, 40: 361
- Daniel L B, et al. Morphometric and genetic identification of eggs of spring-spawning sciaenids in lower Chesapeake Bay. Fish Bull, 1994, 92: 254
- Rocha-Olivares A. Multiplex haplotype-specific PCR: A new approach for species identification of the early life stages of rockfishes of the species-rich genus *Sebastes* Cuvier. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 231: 279
- 朱元鼎, 等. 带鱼亚目. 东海鱼类志. 北京: 科学出版社, 1963. 391~393
- 孟庆闻, 等. 带鱼亚目. 鱼类学(形态·分类). 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 282~283
- Nelson J S. Fishes of the World. 3rd ed. New York: Wiley, 1994