

文章编号:1000-0615(2004)04-0371-04

3 个水域黄鳍鲷线粒体 DNA D-loop 基因序列多态性研究

刘红艳^{1,2}, 江世贵¹, 苏天凤¹, 龚世园²

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510030;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:利用 PCR 技术扩增海南海口市、福建厦门市和广东珠海市 3 个地理群体海捕黄鳍鲷线粒体 D-loop 基因片段,测定了该基因片段 580bp 序列。结果发现,3 个地理群体内和群体间都存在丰富的 DNA 序列多态性,共检测到 33 个多态性核苷酸位点(5.7%),24 个个体具有 22 种单倍型(haplotype)。UPGMA 法构建的分子系统树中,海南群体内所有的单倍型聚成一支,福建与广东的单倍型混杂在一起,聚成一支。从序列差异的分析中得出,海南群体与福建和广东群体的亲缘关系较远;福建群体和广东群体亲缘关系较近。

关键词:黄鳍鲷;线粒体 DNA;D-loop;多态性

中图分类号:S917 文献标识码:A

Polymorphism study of the mitochondrial DNA D-loop gene sequences from *Sparus latus*

LIU Hong-yan^{1,2}, JIANG Shi-gui¹, SU Tian-feng¹, GONG Shi-yuan²

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China;

2. Fisheries College, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: 580bp mitochondrial D-loop gene segments of *Sparus latus* caught in sea from Haikou (Hainan Province), Xiamen (Fujian Province), Zhuhai (Guangdong Province) were amplified with PCR technique and sequenced. The accession numbers are from AF549503 to AF549524 in GenBank. High genetic polymorphism in the three stocks was examined. It was found that 33 nucleotide sites (5.7%) were variable in mtDNA D-loop gene segments, and there were 22 haplotypes in 24 individuals. According to the sequences of mtDNA D-loop gene segments, the genetic distances of inter-and intrapopulation of three stocks were calculated using two-parameter method of Kimura, M(1980). The genetic distances were 1.34%, 1.34% and 1.41% in individuals within stocks of Hainan, Fujian and Guangdong respectively, and 2.71% between Hainan and Fujian stocks, 2.70% between Hainan and Guangdong stocks, 1.33% between Fujian and Guangdong stocks. Nucleotide diversity of sequences demonstrated that Hainan stock has a distant genetic relationship with Fujian stock and Guangdong stock, and the Fujian stock has a close relationship with Guangdong stock. In molecular phylogenetic tree constructed by UPGMA method, all the haplotypes of Hainan samples assembled one branch, while the haplotypes of Fujian and Guangdong samples intermixed together and assembled another branch. These results indicated that Hainan samples belong to a separate population, whereas the Fujian and Guangdong samples belong

收稿日期:2002-11-05

资助项目:国家科技基础工作专项、广东省科技兴海重大项目(A200099A01)、水科院人才基金资助项目

作者简介:刘红艳(1978-),女,湖北荆门人,硕士研究生,现在江汉大学从事分子遗传学和基因工程的研究。E-mail:ws-lhy@163.com

通讯作者:江世贵(1964-),男,湖南澧县人,研究员,主要从事海洋生物技术研究,E-mail:jiangsg@21cn.com

to an identical population. According to these data, we can deduce that gene exchange may exist widely between the stocks of Guangdong and Fujian. Base compositions of the mtDNA D-loop sequence were estimated by statistics programme of software MEGA2.1. Significant differences of base compositions were not observed among the samples of the three populations. The averages of the base A, T, C and G content were 34.1%, 31.4%, 20.3% and 14.2%, respectively. Therefore the total content of base A + T was obviously higher than that of base G + C. There was only one site that base had been inserted or was absent. The amount of transition sites was more than that of transversion sites, which resemble other vertebrate.

Key words: *Sparus latus*; mitochondrial DNA; D-loop; polymorphism

线粒体 DNA 母系遗传,具较高突变率,突变固定后形成的多态性位点可反映出群体遗传特征、种群分化和种属关系等特点^[1],是系统进化和种群遗传研究的理想材料。D 控制区是线粒体上一段非编码区,进化速率快,变异程度高,是探讨近缘种间和种内遗传变异的良好指标^[2,3]。

黄鳍鲷 (*Sparus latus*) 广泛分布于我国广东、福建和海南等省近海,经济价值高,是名贵的海产鱼类之一^[4]。有关其群体分子遗传学还未见专门的报道。本研究测定了海南(HN)、福建(FJ)和广东(GD)3个水域黄鳍鲷群体 mtDNA D-loop 基因片段的核苷酸序列,并以此分析了黄鳍鲷的群体结构和遗传分化程度,为今后的渔业管理、种质资源保护和遗传选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

黄鳍鲷样品于2002年4-5月采自广东珠海(珠江口)、福建厦门(台湾海峡)和海南海口(北部湾),均为海捕鱼,取回后置超低温冰箱-70℃保存。每个水域随机抽取8个个体用于分析。

1.2 总 DNA 的提取

取100 mg左右的鱼背部肌肉,加 TEN9 细胞裂解液(50 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 9.0,100 mmol·L⁻¹ EDTA,200 mmol·L⁻¹ NaCl),终浓度为2% SDS 和终浓度为1 mg·mL⁻¹ Protein K,混匀后,56℃消化过夜,经饱和酚,酚-氯仿(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1),氯仿(氯仿:异戊醇=24:1)抽提,2倍体积无水乙醇和1/10体积 NaAC 沉淀,70%乙醇洗涤后,用灭菌蒸馏水溶解,4℃存放^[5]。

1.3 D-loop 基因片段的 PCR 扩增

扩增 D-loop 基因片段的引物是根据 GenBank 中多种海水鱼相应的同源序列比较后设计的,引物序列为:

L:5' - TTAGTATGGTGACAATGCAT - 3,

H:5' - GACACCATTAACCTTATG CAA - 3'

PCR 反应总体积为 50 μL,其中 10 × Ex Taq Buffer(Takara) 5 μL,Ex Taq polymerase(Takara)0.3 μL(1.5U),dNTP(2.5 mmol·L⁻¹) (Takara) 4 μL,10pmol·μL⁻¹引物 2μL,1μL 模板 DNA,其余为灭菌蒸馏水。扩增条件为:94℃预变性 2 min,之后进行 35 个循环(94℃ 45 s,52℃ 45 s,72℃ 60 s),最后 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶回收纯化后直接进行序列测定。

1.4 序列测定及数据分析

回收纯化后的 PCR 产物送至上海基康公司(Genecore)测序。依 Kimura^[6] 双参数法(two-parameter method)对核苷酸位点的替换数进行统计,计算种群内和种群间的 DNA 序列差异。采用 Mega2.1^[7] 软件中的 statistics 统计 DNA 序列的碱基组成,并用非加权组平均法(unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA)进行聚类分析,构建聚类关系树。

2 结果

2.1 D-loop 区段的序列变异情况

对3个水域黄鳍鲷24个个体总DNA进行PCR扩增,获得580bp的D-loop基因片段。其序列已登陆GenBank,序列号为AF549503-AF549524,因FJ3和FJ4,HN2和HN3序列相同,故24个个体总共申请到22个序列。共检测到33个突变位点(5.7%),如图1。

共有22种单倍型(haplotype),其中海南群体8个个体有7种单倍型,福建群体8个个体有7种单倍型,广东群体每一个个体即为一种单倍型。3个水域黄鳍鲷D-loop基因片段中,A、T、C、G碱基的含量基本相同,平均分别为34.1%,31.4%,20.3%,14.2%,A+T的含量(65.5%)明显高于G+C的含量(34.5%)。产生插入/缺失的位点仅有1个,转换大于颠换,这个结果与其它一些脊椎动物的

数值相类似^[8]。

```

#HN1 ATCTTTTGGGTTACGGCATCTGCTCTTATTCG
#HN2 .....CC.....T.....G...
#HN3 .....CC.....T.....G...
#HN4 .....AC·T.....CA.....G·T·
#HN5 .....CCG.....C.....
#HN6 -·C.....CC.....CT·
#HN7 .....CC·A.....
#HN8 .....AC.....A.....G...
#FJ1 ·C···C·A·ACC···ATG···ATC·C·G··TA
#FJ2 ·C···A·CC···A·G·C···T···G··TA
#FJ3 ·CT···A·AC···GCC···A·C·C·G·CT·
#FJ4 ·CT···A·AC···GCC···A·C·C·G·CTA
#FJ5 ·CT···A·AC···A·GCC··ATC·C·G·CT·
#FJ6 ·C···A·ACC·T·A·G·C··ATC·CCG·T·
#FJ7 ·CT···AAA·C···A·GCC··ATC·C·G·CTA
#FJ8 ·CT···A·A·C···A·GCC··ATC·C·G·CT·
#GD1 ·C···C·A·A·C···A·G···ATC·CCG·CT·
#GD2 ·CTC···AAA·C···A·GCC··ATC·C·G·CT·
#GD3 ·CT···A·A·C···A·GCC··ATC·C·G·CT·
#GD4 ·CT···C·A·C···A·GCC··ATC·C·G·CT·
#GD5 ·CT···A·A·C···A·GCC··ATCTC·G·CT·
#GD6 ·C···A·A·C···A·G···ATC·C·GGCT·
#GD7 ·CT···A·A·C···A·GCC··ATC·CCG·CT·
#GD8 -C. ···A·ACC·T·A·G·C··ATC·CCG·CT·

```

图1 海南、福建和广东黄鳍鲷 D-loop 多态性位点分布
Fig.1 Polymorphic sites of D-loop region in *S. latus* of Hainan, Fujian and Guangdong populations

2.2 黄鳍鲷群体内和群体间的多样性

从表 1 得,海南、福建和广东黄鳍鲷各群体个体间的序列差异分别为 1.34%,1.34%,1.41%;海南与福建群体间的序列差异为 2.71%,海南与广东群体间的差异为 2.70%,福建与广东群体间的序列差异为 1.33%。群体间的序列差异反映了生物间亲缘关系的远近程度。由此可以看出,海南群体与福建和广东群体间的亲缘关系较远,而福建群体与广东群体的亲缘关系较近。

2.3 分子系统树

根据 D-loop 基因序列差异,用 MEGA2.1 构建 UPGMA 分子系统树如图 2。分子系统树形成明显的两大支,海南群体所有的单倍型聚成一支,福建群体和广东群体混杂在一起聚成一支。

3 讨论

Billington 和 Hebert^[9]曾报道海水鱼类中,群体内线粒体 DNA 全序列的差异在 0.2%~4.4%,Graves 和 McDowell^[10]通过对条纹四鳍旗鱼线粒体 DNA 全序列的研究,得出其序列差异为 0.3%。

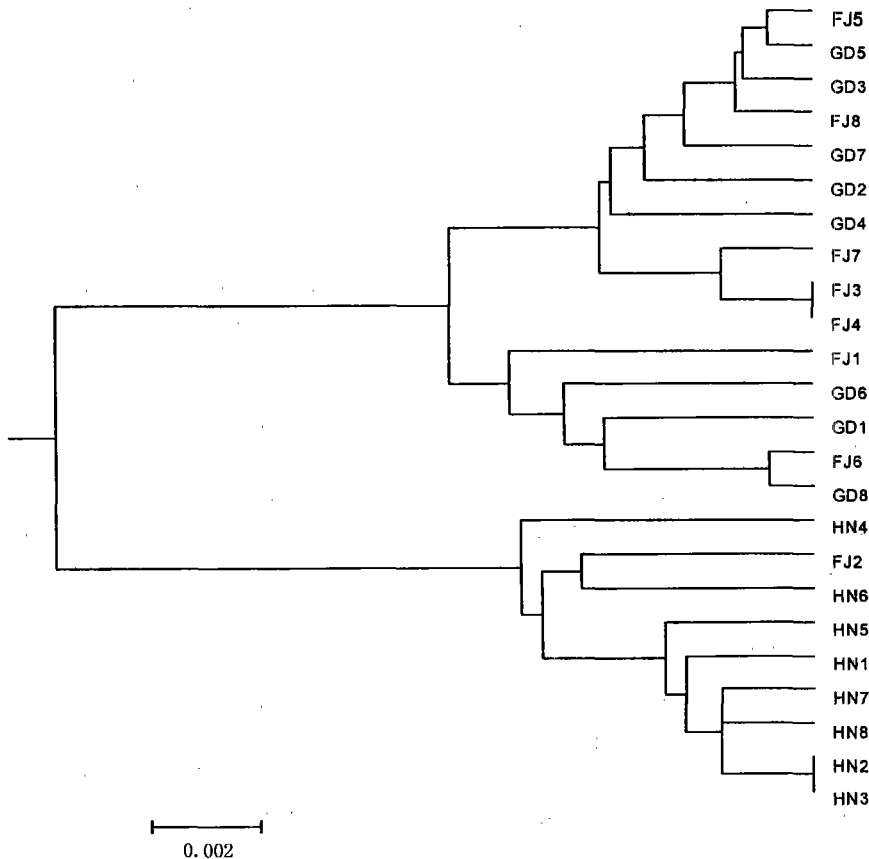


图2 应用 UPGMA 法构建的 D-loop 基因序列的分子系统树
Fig.2 Molecular phylogenetic tree of D-loop gene sequences constructed by the UPGMA method

表1 黄鳍鲷群体内和群体间 D-loop 基因序列差异百分比
Tab.1 Percent nucleotide diversity of D-loop gene sequences within and among populations of *S. latus*

	海南群体 Hainan population	福建群体 Fujian population	广东群体 Guangdong population
海南群体 Hainan population	1.34%		
福建群体 Fujian population	2.71%	1.34%	
广东群体 Guangdong population	2.70%	1.33%	1.41%

结果中,海南、福建和广东各群体内的 D-loop 序列差异分别为 1.34%, 1.34% 和 1.41%, 处于 Billington 等的 0.2% ~ 4.4% 范围内,但显著高于条纹四鳍旗鱼的 0.3% 水平,这跟 Graves 所选取的片段为整个线粒体 DNA 区段(其中包含有相对保守区段),而我们所选取片段的与线粒体 DNA 中 D-loop 进化速率较快的区段有关,从而也进一步证明了在黄鳍鲷线粒体基因中, D-loop 序列区段是进化速率较快的区段,适合于群体分子遗传研究。

从图 1 的分子系统树中看出,海南群体所有的单倍型聚在一起。海南四周环海,与祖国大陆相隔琼州海峡,黄鳍鲷为内湾性和近海性种类,一般不会作大距离迁移;另外海南为热带气候,不同于福建和广东的亚热带气候,因此黄鳍鲷在海南形成特有种群是合理的。值得指出的是,在海南所有单倍型聚成的一支里,还有一种福建的单倍型,有可能是由于人工养殖苗种交流的原因。虽然我们在采样时,尽量采取当地水域的野生品种,但也不可能完全避免采取人工养殖网箱逃逸出来的个体的可能,而此处采到的这个人工养殖的个体,苗种可能来源于海南。但上述现象并不影响我们的整体分析。

福建和广东的单倍型混杂在一起,聚成一大支。两个群体间的差异(1.33%)甚至小于种群内的差异(1.34%, 1.41%),证明福建水域内与广东水域内的黄鳍鲷为同一种群。说明福建群体与广东群体之间存在广泛的基因交流,黄鳍鲷的鱼卵和幼鱼可沿着海湾迁移扩散。

与 Kazuo 和 Akira^[11]对真鲷(*Pagrus major*)和赤鲷(*Pagrus auratus*)种群结构和变异的研究中所发现的变异位点和单倍型数目相比,我们检测到的要小得多,这可能与取样数和取样地点较少有关,可以期望随测试样品数量的增加和取样范围

的增大,可能会检测到更多的变异位点和单倍型,因而有关黄鳍鲷种群的变异程度,有待进一步的深入。

参考文献:

- [1] Cano R L, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA [J]. *Genetics*, 1984, 106: 479 - 499.
- [2] Rosel P E, Dizon A E, Haygood M G. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995, 52: 1421 - 1429.
- [3] Rosel P E, Haygood M G, Perrin W F. Phylogenetic relationship among the true porpoise (*Cetacean Phocoenidae*) [J]. *Mol Phyl Evol*, 1995, 4(4): 463 - 474.
- [4] Editorial Group of the Fish Fauna in Fujian Province. The fish fauna of Fujian Province [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1985. [福建鱼类志编写组. 福建鱼类志 [M]. 福州: 福建科学出版社, 1985.]
- [5] Yoder A D, Cartmill M, Ruvolo M, et al. Ancient single origin for Malagasy primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5122 - 5126.
- [6] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence [J]. *Mol Evol*, 1980, 16: 111 - 120.
- [7] Kumar S, Tamura K, Nei M, et al. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis [CP/DK]. Ver. 1.02. University Park, the Pennsylvania State University, 1994.
- [8] Saccone C, Pesole G, Sbisà E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA [J]. *Mol Evol*, 1987, (26): 205 - 211.
- [9] Billington N, Hebert P D. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, 48(Suppl. 1): 80 - 94.
- [10] Graves J E, McDowell J R. Genetic analysis of striped marlin (*Tetrapturus saudax*) population structure in the Pacific Ocean [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1994, 51: 1762 - 1768.
- [11] Kazuo T, Akira M. RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in Red Sea Bream *Pagrus major* population from four locations of western Japan [J]. *Fish Sci*, 1997, 63(2): 211 - 217.