

## 刀鲚与湖鲚线粒体细胞色素 *b* 基因片段多态性及遗传关系\*

程起群<sup>1,2</sup>, 温俊娥<sup>3</sup>, 王云龙<sup>1</sup>, 韩金娣<sup>1</sup>, 卢大儒<sup>2\*\*\*</sup>

(1: 农业部海洋与河口渔业重点实验室, 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

(2: 复旦大学遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

(3: 上海复生生物工程研究所, 上海 200433)

**摘要:** 使用线粒体细胞色素 *b* 基因片段序列为分子标记, 分析了刀鲚和湖鲚的遗传多态性及遗传关系. 在两个群体中共检测到 5 种不同的单倍型. 刀鲚和湖鲚的单倍型多样性指数分别为 0.9000 和 0.7000; 核苷酸多样性指数分别为 0.3763% 和 0.4301%. 分子方差分析显示两者遗传分化的水平很低, 群体间的差异对总的变异没有贡献. 所以认为它们之间的差异尚未达到亚种水平, 这一结果支持湖鲚是刀鲚的一个地理种群的观点.

**关键词:** 刀鲚; 湖鲚; 细胞色素 *b*; 遗传多样性; 遗传差异; 进化

## Genetic diversity and genetic differentiation between *Coilia ectenes* and *Coilia ectenes taihuensis* inferred from cytochrome *b* gene segment sequence of mitochondrial DNA

CHENG Qiqun<sup>1,2</sup>, WEN June<sup>3</sup>, WANG Yunlong<sup>1</sup>, HAN Jindi<sup>1</sup> & LU Daru<sup>2</sup>

(1: Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, P. R. China)

(2: State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, P. R. China)

(3: Shanghai Fusheng Institute of Bio-engineering, Shanghai 200433, P. R. China)

**Abstract:** Genetic diversity and genetic differentiation between *Coilia ectenes* and *Coilia ectenes taihuensis* have been investigated at the mtDNA level. Sequences analysis of cytochrome *b* (cytb) gene segments amplified by PCR was used. Five different haplotypes were detected between the populations studied. The haplotype diversity of *C. ectenes* and *C. e. taihuensis* were 0.9000 and 0.7000, respectively. The nucleotide diversity of *C. ectenes* and *C. e. taihuensis* were 0.3763% and 0.4301%, respectively. An hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) showed that very low levels of genetic partitioning, with 0.00% of the total variation attributed to between population differences, and lack of genetic structure. Our results supported that *C. e. taihuensis* is a geographical population of *C. ectenes*; their difference has not risen to subspecies level.

**Keywords:** *Coilia ectenes*; *Coilia ectenes taihuensis*; cytochrome *b*; genetic diversity; genetic differentiation; evolution

鲚属鱼类 (genus *Coilia*, Gray, 1831) 属于鲱形目鳀科, 是中小型鱼类. 在中国境内有 4 种: 刀鲚 (*C. ectenes*)、凤鲚 (*C. mystus*)、七丝鲚 (*C. grayii*) 和短颌鲚 (*C. brachygnathus*)<sup>[1]</sup>.

其中, 刀鲚是溯河产卵的洄游性鱼类. 每年繁殖季节来临时, 刀鲚会从近海水域向淡水水域做繁殖洄游. 亲鱼逆水而上, 在长江的中下游产卵, 也在长江附属的湖泊中产卵. 湖鲚是刀鲚一种定居型. 它没有洄游

\* 中国水产科学研究院青年基金项目(2003-青-4)、农业部海洋与河口渔业重点实验室开放课题(开-1-04-14)和农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室开放课题(实开 2005-06)共同资助. 2005-07-22 收稿; 2005-08-25 收修改稿. 程起群, 男, 1972 年生, 博士, 副研究员, E-mail: qiquncheng@gmail.com.

\*\* 通讯作者.

的习性,终生生活在中国第三大淡水湖——太湖<sup>[2]</sup>.

刀鲚和湖鲚的分类地位至今仍存有争议.袁传宓等根据它们之间传统的形态可数性状、生态和生理差异等,认为湖鲚是刀鲚的一个亚种<sup>[3,4]</sup>;但刘文斌<sup>[5]</sup>基于同工酶和形态学解剖资料认为它们之间的差异尚未达到亚种水平;程起群和韩金娣<sup>[6]</sup>通过对刀鲚与湖鲚诸多形态框架性状的比较,计算出它们的差异系数均小于亚种的临界值,故而支持它们之间的差异尚未达到亚种水平的观点.

然而鱼类的形态变异更易受到环境影响<sup>[7,8]</sup>.因此,为阐明两者之间的分类关系,需要使用更多的标记.其中较为稳定的是分子标记.线粒体 DNA 具有分子结构稳定、母系遗传、相对快的替换速率、缺少重组等特征,已被证明是动物群体进化研究中的一种有用的分子标记<sup>[9-11]</sup>,可以为种群遗传结构、地理变异及物种特性的研究提供有效的信息<sup>[12-14]</sup>.

细胞色素 *b* (Cytb) 基因是线粒体 DNA 上结构和功能以及进化动力学以及其蛋白质产物的生物化学特性较为清楚的基因<sup>[15,16]</sup>.在鱼类群体与进化遗传学中有广泛的应用<sup>[17-19]</sup>.

将线粒体 DNA 用于刀鲚的群体遗传学研究尚未见公开报道.本研究从刀鲚湖鲚线粒体 cytb 基因片段序列分析入手,探讨了两者遗传多样性水平及遗传差异,以期对深入理解刀鲚与湖鲚的分类关系有所帮助.

## 1 材料和方法

### 1.1 样本收集

刀鲚样本取自上海长江口(N31°37', E121°80'),湖鲚样本取自无锡太湖(N31°38', E120°10').各取5尾,共10尾.立即用干冰保藏运至实验室,储存于-80℃冰箱待用.

### 1.2 DNA 提取,PCR 扩增及测序

总基因组 DNA 取自肌肉组织.肌肉组织先剪碎,然后用蛋白酶 K 消化过夜,然后酚氯仿抽提,最后是100%乙醇沉淀<sup>[20]</sup>.其中酚、氯仿、乙醇为上海菲达工贸有限公司产品,蛋白酶 K 为 Merck 公司产品. DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测(BioWest 产品)后稀释到合适的浓度,用做 PCR 扩增的模板.

使用两个通用引物即 L14724 和 H15915<sup>[21]</sup>扩增 cytb 基因.引物序列为:L14724,5' - GACTTGAAAAAC-CACCGTTG - 3';和 H15915,5' - CTCCGATCTCCGGATTACAAG AC - 3'.扩增反应混合物包括以下成分:DNA 模板 100ng, dNTPs 0.2mmol/L, 通用引物各 1.0μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 4.0 mmol/L, 10 × reaction buffer 5.0μl, Taq 酶 2U, 加无菌重蒸水至终体积 50μL.引物及 PCR 混合物为上海生工生物工程有限公司产品.

PCR 扩增程序为:94℃变性 4min, (94℃ 50s, 55℃ 1min, 72℃ 1min30s) × 35 循环, 72℃延伸 7min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶(1 × TAE 配制)电泳检测, EB 染色, 复日 FR980 型凝胶成像系统拍照记录;所用的分子量标准为 Takara 产品, 编号 DL2000.

目标扩增产物用回收试剂盒(上海中科开瑞生物芯片科技有限公司产品)回收.回收产物纯化后用 ABI3730 测序仪测序.为保证所测序列的可靠性,各样品均采用双向测序.测序引物为 L15519, 5' - GGAGACCCAGAAAAC TTTACCCC - 3' 和 H15915<sup>[21]</sup>.

### 1.3 数据分析

双向测序结果用 DNASTAR 软件包进行拼接、核对序列. DNA 序列差异用 MEGA2.1<sup>[22]</sup>进行计算.

计算群体内基因型多样性(haplotype diversity, H)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)以及单倍型之间的歧化距离<sup>[23, 24]</sup>.群体间的差异用 Raymond 和 Rousset<sup>[25]</sup>的测试方法进行.群体间的遗传分化程度用固定指数( $F_{ST}$ )来估计<sup>[26]</sup>.使用分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)来区分方差成分:(1)群体间方差;(2)群体内个体间的方差.这样来评估假定的空间遗传结构模式.以上分析均在软件 ARLEQUIN 2.0<sup>[27]</sup>上进行.

## 2 结果

### 2.1 细胞色素 *b* 基因扩增结果

刀鲚和湖鲚的 cytb 基因均能被清晰稳定的扩增, PCR 产物电泳结果如图 1.可以看出, PCR 产物是 1300bp 左右.

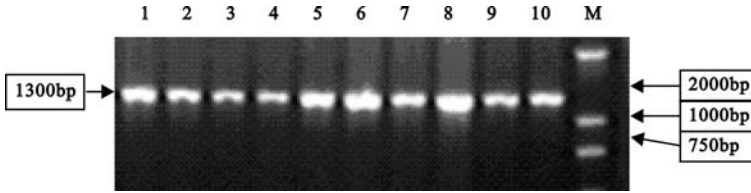


图1 *cytb* 基因 PCR 产物电泳图 由左至右的泳道依次为:湖鲚(1-5)和刀鲚(6-10)

Fig. 1 Electrophoresis map of *cytb* gene PCR products

From left to right: *C. e. taihuensis* (1 to 5) and *C. ectenes* (6 to 10)

## 2.2 细胞色素 *b* 基因片断序列

双向测序结果经拼接核对后,获得刀鲚与湖鲚样本 *cytb* 基因的一致序列 (consensus sequence) 372bp (图2). 结果显示刀鲚和湖鲚的一致序列中共检测到五种单倍型 (Type1 表示第一种单倍型, Type2 表示第二种单倍型, 依次类推), 一致序列共有 6 个变异位点, 总变异为 1.61%. 变异率很低, 表明两者之间差异不大.

## 2.3 遗传多态性和遗传差异比较

刀鲚和湖鲚的群体内单倍型多样性 ( $h$ ) 分别为 0.9000 和 0.7000, 平均为 0.8000. 两群体的核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 分别为刀鲚 0.3763 和湖鲚 0.4301, 平均为 0.4032 (表1). 各单倍型在刀鲚和湖鲚中的分布见表1, 5种单倍型之间的估计核苷酸趋异值是介于 0.3% - 1.1% 之间 (表2). 刀鲚群体内差异很小, 仅为 0.3% - 0.5%. 湖鲚稍大, 为 0.3% - 1.1% 之间.

表1 两群体单倍型多样性和标准误及核苷酸多样性 (%)

Tab. 1 Haplotype frequencies, haplotype diversity including standard error, nucleotide diversity (%) of the two populations studies

单倍型 haplotype	刀鲚 <i>C. ectenes</i>	湖鲚 <i>C. e. taihuensis</i>
单倍型 1 Type1	1	3
单倍型 2 Type2	2	1
单倍型 3 Type3	1	0
单倍型 4 Type4	1	0
单倍型 5 Type5	0	1
单倍型多样性 Haplotype diversity	0.9000	0.7000
标准误 Standard error	0.1610	0.2184
核苷酸多样性 Nucleotide diversity (%)	0.3763	0.4301

表2 五种单倍型之间的进化距离估计

Tab. 2 Estimates of evolutionary distance among the 5 haplotypes

	单倍型 1	单倍型 2	单倍型 3	单倍型 4	单倍型 5
单倍型 1					
单倍型 2	0.003				
单倍型 3	0.003	0.005			
单倍型 4	0.003	0.005	0.005		
单倍型 5	0.008	0.011	0.011	0.011	

Type1	TTC CTC TTT GCC TAC GCT ATT CTA CGA TCG ATT CCT AAT AAG TTA GGA GGG GTA
Type2	... ..
Type3	... .. G ... ..
Type4	... .. T. ... ..
Type5	... .. C ... .. A ... ..
Type1	TTA GCG CTA TTA TTC TCA ATC CTT GTC CTC ATA GTA GTA CCA ATT CTT CAT ACC
Type2	... ..
Type3	... ..
Type4	... ..
Type5	... ..
Type1	TCT AAA CAACGG GGC CTA ACC TTC CGG CCC CTC ACA CAA TTC CTT TTC TGA ACT
Type2	... ..
Type3	... ..
Type4	... ..
Type5	... .. A ... ..
Type1	CTG GTC GCAGAC GTA ATT ATC TTA ACA TGA ATC GGAGGA ATA CCT GTT GAA CAC
Type2	... .. A. ... ..
Type3	... ..
Type4	... ..
Type5	... ..
Type1	CCT TTC ATT ATT ATT GGT CAA ATC GCA TCA GTA CTC TAC TTC ACC CTA TTT TTA
Type2	... ..
Type3	... ..
Type4	... ..
Type5	... ..
Type1	GTA CTA AGTCCC CTA GCA GGC TGA CTA GAA AAC AAA GCG CTC AAC TGA AAC TGC
Type2	... ..
Type3	... ..
Type4	... ..
Type5	... ..
Type1	CCT AGT AGCTTA AAT TAA AGC GCC GGT CTT GTA ATC CGG AGA TCG GAG
Type2	... ..
Type3	... ..
Type4	... ..
Type5	... ..

图2 刀鲚和湖鲚线粒体 cytb 基因片断一致序列

Fig. 2 The consensus sequences of mitochondrial cytb gene segment from *C. ectenes* and *C. e. taihuensis*

Raymond 和 Rousset<sup>[25]</sup> 测试,显示两者群体差异的  $p$  值是  $0.57180 \pm 0.01277$ ,表明单倍型是随机分布的.分子方差分析(AMOVA)揭示群体间的遗传变异对总的遗传变异几乎没有贡献(=0.00%),所有的变异(100.00%)是在群体内个体间.群体间的差异不显著,提示这两个群体还没有形成相互隔离的遗传结构,可能还是一个随机交配的群体.

### 3 讨论

#### 3.1 刀鲚湖鲚的遗传关系及遗传分化

太湖基底形成于约 11000 年前的末次冰期的盛冰期(Last Glacial Maximum)<sup>[28]</sup>.海水进入西太湖,并形成海湾<sup>[29]</sup>.大约 5000 年前,西太湖由咸水湖泊变成淡水湖泊<sup>[30]</sup>.据此推测,湖鲚和刀鲚的趋异时间应该在 5000 年至 11000 年之间.

而我们结果则显示:5 种单倍型之间的趋异水平在 0.3% 至 1.1% 之间,落在 Billington 和 Hebert<sup>[10]</sup> 报道的种内趋异(10%)的范围内.组合单倍型 1 (Type1) 占有分析的个体的 40%,因此可以假设这些单倍型有一个共同的祖先 mtDNA 单倍型.如果采用常用的进化速率值(每百万年有 2% 的趋异<sup>[14]</sup>),那么这些单倍型之间趋异的时间应在 0.15 百万年至 0.55 百万年之间.可见 mtDNA 单倍型的趋异要早于两种群的分化,其分化时间甚至早于湖鲚进入淡水环境.

基于以前的形态学和同工酶资料,对于刀鲚和湖鲚的分类关系不能形成定论<sup>[3-6]</sup>. Raymond 和 Rousset<sup>[25]</sup> 测试表明单倍型是随机分布的. AMOVA 分析揭示群体间的变异对总的变异没有贡献,提示两者之间缺少隔离的遗传结构.我们的研究结果表明刀鲚和湖鲚之间的差异,仍然是地理种群的差异,尚未上升到亚种水平.这与刘文斌<sup>[5]</sup> 的同工酶结果是一致的.

#### 3.2 刀鲚湖鲚的遗传多态性

核苷酸多样性( $\pi$ )是表示每个群体内,各个单倍型的两两配对差异的平均值,是一个群体的遗传多样性指标.我们知道,湖鲚群体是由少数刀鲚的亲鱼演变形成的.由于奠基者效应(founder effect)等因素的影响,湖鲚的遗传多样性水平应该低于刀鲚,因此刀鲚的  $\pi$  值应该大于湖鲚.但我们却得到了相反的结果.这可能有两方面的原因:①湖鲚遗传多样性水平增加:为改进太湖水质,太湖流域管理委员会自 2000 年夏季启动了“引江济太”工程,每年引  $(10-15) \times 10^8 \text{ m}^3$  长江水入太湖<sup>[31]</sup>.刀鲚有可能随长江水进入太湖,并与湖鲚相互杂交,形成基因流,增加湖鲚遗传多样性水平和遗传变异性.②刀鲚群体遗传多样性水平下降:由于巨大的捕捞压力和水环境的恶化,造成该区域刀鲚有效群体大小的迅速下降.事实上,刀鲚种群数量在最近的 30 年内急剧下降,产量已从 1978 年的 190 t 下降到 2002 年的 42 t<sup>[32]</sup>.可能是由于刀鲚群体变小和瓶颈效应的影响导致刀鲚群体遗传多样性水平的下降.

致谢 江苏省太湖渔业管理委员会朱茂晓工程师和曹萍工程师,淡水渔业研究中心刘奇哲研究员,本所罗民波博士在采样过程中提供帮助,谨致谢忱.

### 4 参考文献

- [1] 袁传宓,秦安龄.我国近海鲚鱼生态习性及其产量变动状况.海洋科学,1984,7(5):35-37.
- [2] 中国水产科学研究院东海水产研究所,上海市水产研究所.上海鱼类志.上海:上海科技出版社,1990.
- [3] 袁传宓,林金榜,秦安龄,刘华仁.关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状.南京大学学报(自然科学版),1976,2:1-12.
- [4] 袁传宓.关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼种下分类的探讨.南京大学学报(自然科学版),1980,3:67-82.
- [5] 刘文斌.中国鲚属四种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究.海洋与湖沼,1995,26(5):558-564.
- [6] 程起群,韩金娣.刀鲚两种群的形态变异和综合判别,湖泊科学,2004,16(4):356-364.
- [7] Allendorf F W, Ryman N, Utter F M. Genetics and fishery management. In: Ryman N, Utter F eds. Population genetics and fishery management. University of Washington, Seattle, 1987:1-19.
- [8] Wimberger P H. Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two spe-

- cies of Geophagus (Pisces: Cichlidae). *Biol J Linn Soc*, 1992, **45**:197 – 218.
- [9] Avise J C, Arnold J, Ball R M, *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst*, 1987, **18**:489 – 522.
- [10] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, **48**(suppleI) : 80 – 94.
- [11] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. In: Wolstenholme D R and JeonKW(eds) International review of Cytology/A survey of Cell Biology-Mitochondrial Genomes, V. 141. New York:Academic Press, 1992: 173 – 216.
- [12] Graves J E. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *J Hered*, 1998, **89**: 427 – 437.
- [13] Avise J C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet*, 1991, **25**:45 – 69.
- [14] Avise J C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York:Chapman and Hall, 1994.
- [15] Iwin D W, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991, **32**: 128 – 144.
- [16] Esposti M D, Vries S D, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochem Biophys Acta*, 1993, **143**: 243 – 271.
- [17] Bennetts R Q, Grady J M, Rohde F C, Quattro J M. Discordant patterns of morphological and molecular change in broadtail madtoms (genus *Noturus*). *Mol Ecol*, 1999, **8**: 1563 – 1569.
- [18] Mcveigh H P, Davidson W S. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *J Fish Biol*, 1991, **39**(supplement A) : 277 – 282.
- [19] Cantatore P, Roberti M, Pesole G. Evolutionary analysis of cytochrome b sequence in some Perciformes : evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J Mol Evol*, 1994, **39**: 589 – 597.
- [20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [21] Xiao W H, Zhang Y P, Liu H Z. Molecular Systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, Biogeography, and Coevolution of a Special Group Restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, **18**:163 – 173.
- [22] Sudhir K, Tamura K, Ingrid B J, *et al.* MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001.
- [23] Nei M, Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 1981, **97**:145 – 167.
- [24] Nei M, Miller J C. A simple method for estimating average number of nucleotide substitution within and between populations from restriction data. *Genetics*, 1990, **125**:873 – 879.
- [25] Raymond M L, Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 1995, **49**: 1280 – 1283.
- [26] Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen*, 1951, **15**:323 – 354.
- [27] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN ver 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- [28] 孙顺才, 黄漪平. 太湖. 北京: 海洋出版社, 1993.
- [29] Chang W Y B, 许雪珉, 杨景荣, 刘金陵. 从沉积物的特征谈太湖的演变. 湖泊科学, 1994, **6**(3): 217 – 226.
- [30] Chang W Y B, 刘金陵. 11,000 年以来太湖的形成和演变. 古生物学报, 1996, **35**(2): 129 – 135.
- [31] 刘春生. 实施引江济太探索流域治水新思路. 中国水利, 2001, **1**: 65 – 66.
- [32] 施德龙, 龚洪新. 关于保护长江口刀鲚资源的建议. 海洋渔业, 2003, **2**: 96 – 97.