

doi: 10.7541/2019.035

基于线粒体CO I和16S rRNA基因序列比较分析 东海带鱼群体遗传多样性

卞光明^{1,2} 王娜玲¹ 胡则辉¹ 王跃斌¹ 胡成硕¹ 柴学军¹

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江海洋大学海洋与渔业研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 舟山 316021;

2. 江苏省射阳县长荡镇农业技术推广服务中心, 盐城 224322)

摘要: 测定了东海带鱼(*Trichiurus lepturus* Linnaeus)三个群体(命名为A: 122°32'E 29°55'N、B: 123°30'E 26°75'N; C: 124°24'E 27°26'N)72个个体的线粒体DNA 16S rRNA和CO I 基因序列,通过单基因序列和联合序列分析,研究了东海带鱼群体的遗传变异情况。分别得到1130 bp的CO I 基因序列片段和554 bp的16S rRNA序列片段,其中CO I 基因片段的T、C、A、G含量分别为29.0%、28.9%、24.4%和17.7%; 16S rRNA基因片段的T、C、A、G含量分别为22.7%、27.6%、28.0%和21.7%。基于线粒体16S rRNA、CO I 和16S+CO I 基因序列分析,72个个体中分别确定43个、8个和49个单倍型,存在单倍型共享现象。群体的单倍型多样性指数为0.9766—0.9992,显示了群体内的单倍型较为丰富。3个群体间各序列平均核苷酸差异数(K)在5.111—9.024和0.0045—0.0076,核苷酸多样性指数(π)为0.0048—0.0084,显示不同带鱼群体遗传多态性丰富。使用邻接法构建的分子进化树揭示同一群体内大部分个体聚在一起。分析结果表明,群体A遗传背景比群体B、群体C较为丰富,群体内部个体差异大于群体间差异,群体间基因交流频率较高,遗传分化不明显,初步判定东海带鱼3个群体的遗传多样性偏低。

关键词: 东海带鱼; CO I; 16S rRNA; 遗传多样性

中图分类号: Q346+.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2019)02-0282-09

带鱼(*Trichiurus lepturus*)隶属鲈形目(Perciformes),带鱼科(Trichiuridae),带鱼属(*Trichiurus*),是东海区最重要的渔获对象,其捕捞产量居于经济鱼类产量之首。由于捕捞强度日益增大以及环境因子变化,东海带鱼资源面临巨大压力,出现渔获质量较差、群体组成小型化、性成熟提前以及年龄结构失衡等现象,开展带鱼种质资源研究工作刻不容缓。

带鱼种群的适应能力、生存能力以及进化潜力都与其遗传多样性有关联,所以群体遗传多样性分析是开展种质资源保护工作的前提和基础。线粒体DNA分子量小、进化速度快,突变形成的多态位点可反映出群体遗传特征、种群分化等特点,是

研究群体分化以及种质资源评估的理想手段^[1]。线粒体CO I 基因进化速率快,包含遗传进化信息量大,16S rRNA基因结构序列较为保守,可以简便地使用通用引物进行PCR扩增,因此,CO I 与16S rRNA基因在生物群体遗传学中应用广泛^[2-7]。

目前东海带鱼的研究主要集中在摄食^[8]、资源评估模型应用^[9]、繁殖^[10]、资源动态^[11]等方面,关于东海带鱼分子标记群体分析,仅见郑文娟等^[12]基于线粒体控制区分析3个舟山海域带鱼群体多样性。本文基于线粒体CO I 和16S rRNA基因对东海海域3个带鱼群体进行比较分析遗传距离,构建分子系统树,探讨东海带鱼不同群体基因交流情况,以期从线粒体水平上了解东海带鱼资源的遗传背

收稿日期: 2017-11-21; **修订日期:** 2018-03-16

基金项目: 浙江省科技厅科技计划项目(2013F50003和2017F10019); 浙江省海水增养殖重点实验室重点项目资助 [Supported by Zhejiang Science and Technology Program (2013F50003, 2017F10019); Key Program for Key Laboratory of Mariculture & Enhancement of Zhejiang Province]

作者简介: 卞光明(1992—),男,江苏连云港人;硕士研究生;研究方向为种质与种苗工程。E-mail: mingbg@163.com; 王娜玲(1992—),女,重庆人;硕士研究生;研究方向为种质与种苗工程。E-mail: naling_wang@163.com,并列第一作者

通信作者: 柴学军(1972—),男,浙江舟山人;教授级高工;研究方向为鱼类繁育与海洋生物技术。E-mail: chaixj6530@sohu.com

景, 为带鱼资源的合理开发提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的东海带鱼样品由双拖船取自中国东海海域不同的3个群体, 现场取其背部肌肉置于酒精中保存, 并编号A、B、C, 每群体样本数、采集地点、采集时间分别为群体A (19、122°32'E 29°55'N、2015年10月)、群体B (34、123°30'E 26°75'N、2016年4月)、群体C (19、124°24'E 27°26'N、2016年4月)置于超低温冰箱(-70℃)保存备用, 具体采样情况见图1(坐标系为WGS84)。

1.2 实验方法

基因组DNA的提取 采用TIANamp Marine Animals DNA Kit试剂盒推荐的方法提取带鱼基因组总DNA, 通过0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用Nanodrop 2000测DNA的质量与浓度, 置于-20℃保存。

线粒体CO I 基因扩增及测序 从GenBank中下载带鱼线粒体CO I 基因序列^[13], 运用Oligo7软件^[14]设计CO I 基因PCR扩增引物: CO I -F: 5'-CGTGGCAATTACCCGTTGATTCTTCT-3'和CO I -R: 5'-GACTGCACTAAGACAAAGGCTGGTT-3'(上海生工合成), 目的基因片段大小约1500 bp。PCR扩增体系为25 μL, 包含2×Taq MasterMix(康维世纪)12.5 μL, 模板DNA 100 ng, 10 μmol/L的引物各1 μL, ddH₂O补足至25 μL。PCR反应条件为: 94℃预变性5min; 94℃变性1min、50℃退火90s、

72℃延伸45s, 共35个循环; 最后72℃延伸10min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测验证条带的大小后, 送往上海杰李生物技术公司进行纯化和双向测序。

线粒体16S rRNA片段扩增及测序 所用引物序列^[15]为16S-F:5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3'和16S-R:5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'(上海生工合成), 目的片段大小约600 bp。PCR反应总体积为25 μL, 含有模板DNA 100 ng, 0.5 μL上、下游引物(10 μmol/L), 最后补充去离子水至25 μL, 反应程序为: 94℃预变性2min, 然后进行35个循环, 每个循环包括94℃ 45s, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 在最后一个循环结束后在72℃延伸10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后委托上海杰李生物公司进行正向测序。

1.3 数据处理

用ContigExpress Project^[16]对测序结果进行拼接, 然后使用BioEdit^[17]对所得序列进行编辑及人工核查。利用DnaSP 5.0软件^[18]计算群体的单倍型(*H*)、核苷酸多态位点数(*S*)、平均核苷酸多态性(*K*)、核苷酸多样性指数(π)、遗传分化系数(G_{st})与固定系数(F_{st}), 进行Tajima中性检验^[19]。用MEGA 5.0软件^[20]分析序列碱基组成, 并使用Kimura two-Parameter模型计算带鱼群体间的遗传距离, 利用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建个体间的分子进化树, 并采用Bootstrap 1000检验系统树各分支的置信度。

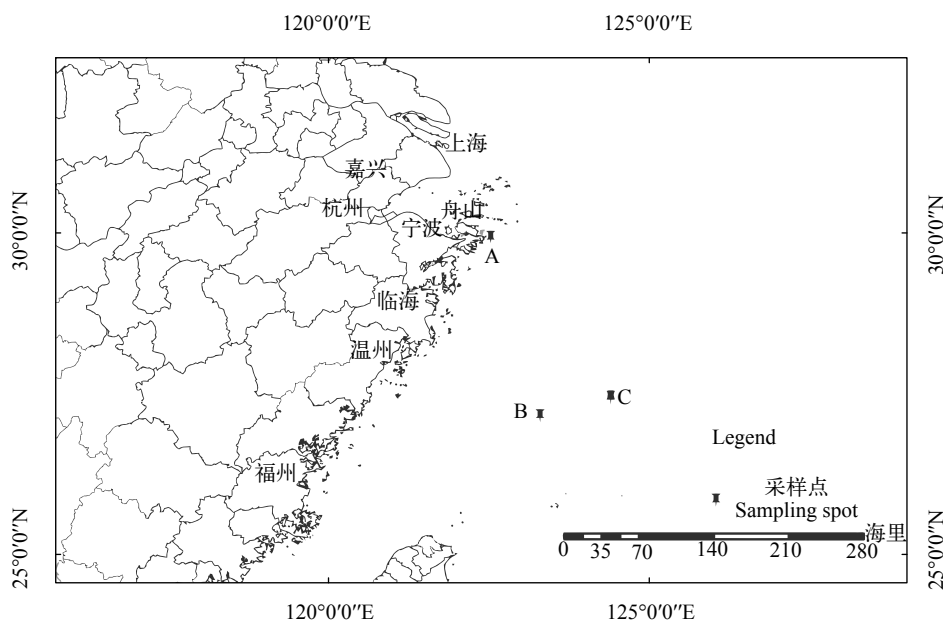


图1 采样点地理位置

Fig. 1 Locations of the sampling stations

2 结果

2.1 线粒体CO I 和16S rRNA基因片段序列特征分析

测序得到的目的片段经BioEdit比对及人工校正去除序列端部不稳定部分,并通过BLAST分析比较,确认得到1130 bp的CO I 基因片段和554 bp的16S rRNA基因片段。通过MEGA 5.0软件计算72个带鱼样品的CO I 和16S rRNA序列的碱基组成,CO I 基因序列碱基T、C、A、G和A+T的平均含量分别为29.0%、28.9%、24.4%、17.7%和53.4%;16S rRNA基因序列的碱基T、C、A、G和A+T的平均含量分别为22.7%、27.6%、28.0%、21.7%和50.7%,A+T含量均略高于C+G,符合硬骨鱼类线粒体DNA CO I 和16S rRNA基因片段的碱基组成特征。

16S rRNA基因片段共检测到8种单倍型(Hap 1—Hap 8), 8个多态位点, 约占总序列的1.44%, 包括5个单一变异位点和3个简约信息位点(表 1)。其中, 转换位点7个, 包含1个A/G转换, 位于241位点; 6个C/T转换, 分别位于169、170、232、256、326以及329位点。1个A/T颠换, 位于320位点, 转换/颠换率R为7。群体A、群体B、群体C共用3个单倍型, 其余单倍型均为每个群体独享, 单倍型1在群体中分布频率为79% (72个个体)。CO I 基因序列检测到43种单倍型, 多态位点49个, 约占总序列的4.34%, 包括20个单一变异位点和简约信息位点29个(表 2)。其中, 转换位点42个, 颠换位点7个, 无插入/缺失位点, 转换/颠换率R为6。

2.2 群体遗传多样性分析

本实验将16S rRNA基因片段和CO I 基因片段合并为一条总长度为1684 bp (不包括插入/缺失)的片段, 以用于群体遗传多样性分析。通过DnaSP

5.0软件统计带鱼群体16S rRNA、CO I 和联合基因序列遗传多样性参数(表 3)。

基于CO I 基因片段, 群体A单倍型多样性(H_d)最高(0.9983), 群体B与群体C的单倍型多样性相近。群体A的平均核苷酸差异数(K)和核苷酸多样性指数(P_i)在3个群体中均最高, 分别为7.111和0.0063, 其次为群体C (5.766和0.0051)、群体B (5.111和0.0045)。基于16S rRNA基因片段, 群体A的单倍型多样性(H_d)最高为0.4678, 群体B、群体C相近。群体A平均核苷酸差异数(K)和核苷酸多样性指数(P_i)分别为0.632和0.0011, 在3个群体中均处于最高值, 群体C(0.596和0.0011)、群体B(0.512和0.0009)次之。根据16S rRNA和CO I 联合基因片段, 群体A单倍型多样性(H_d)最高(0.9992), 群体B与群体C的单倍型多样性接近。群体A的平均核苷酸差异数(K)和核苷酸多样性指数(P_i)在3个群体中均最高, 分别为9.014和0.0076, 其次为群体C (7.021和0.0066)、群体B (6.732和0.0058)。根据各遗传多样性参数比较3个群体, 线粒体单基因和联合基因片段得出的结果一致。

2.3 遗传分化分析

群体内遗传分化 基于带鱼CO I 和16S rRNA基因序列, 用MEGA 5.0构建NJ系统树(图 2、图 3), 拓扑图显示, 同一群体内大部分个体首先聚在一起, 存在不同群体间带鱼个体聚合, 这个现象与带鱼群体内和群体间的遗传距离差异较小以及群体间的遗传分化系数较低相一致。

群体间遗传分化 基于CO I 基因序列片段, 3个群体间, 群体A与群体C遗传距离最大(0.0061), 群体B与群体C种间遗传距离最小(0.0048), 这与群体地理位置远近相符合, 群体A遗传距离最大, 其次为群体B、群体C, 分别为0.0063、0.0051和0.0046(表 4)。基于16S rRNA和联合16S rRNA和CO I 基

表 1 带鱼单倍型16S rRNA基因序列片段及变异位点分布

Tab. 1 Variable sites of 16S rRNA gene sequence from different haplotypes of *T. lepturus*

核苷酸多态位点 Site	1	1	2	2	2	3	3	3	单倍型数分布 Distribution of haplotypes		
	6	7	3	4	5	2	2	2	A	B	C
	9	0	2	1	6	0	6	9			
Hap1	T	C	T	G	C	T	C	T	14	27	15
Hap2	.	.	.	.	.	.	.	C	1	0	0
Hap3	.	.	.	A	.	.	.	.	1	0	0
Hap4	C	.	.	.	.	.	.	.	1	3	2
Hap5	.	.	.	.	T	A	.	.	1	2	2
Hap6	.	.	.	.	.	.	T	.	1	0	0
Hap7	.	T	.	.	.	.	.	.	0	1	0
Hap8	.	.	C	.	.	.	.	.	0	1	0

表 3 带鱼不同群体内线粒体DNA单倍型多样性

Tab. 3 Haplotype diversity (*H*) of mtDNA in three populations of *T. lepturus*

遗传多样性参数 Diversity parameter	A	B	C
单倍型数 Number of haplotypes (<i>H</i>)	17/6/18	25/5/28	15/3/17
单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>H_d</i>)	0.9983/0.4678/0.9992	0.9768/0.3672/0.9814	0.9766/0.3743/0.9809
平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide differences (<i>K</i>)	7.111/0.632/9.014	5.111/0.512/6.732	5.766/0.596/7.021
核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity (<i>P_i</i>)	0.0063/0.0011/0.0076	0.0045/0.0009/0.0058	0.0051/0.0011/0.0066

注: 表格中数字分别为CO I 参数, 16S参数和16S+CO I 参数; 下同
Note: The numbers are CO I parameter, 16S parameter and combined 16S and CO I parameter in the table; the same applies below

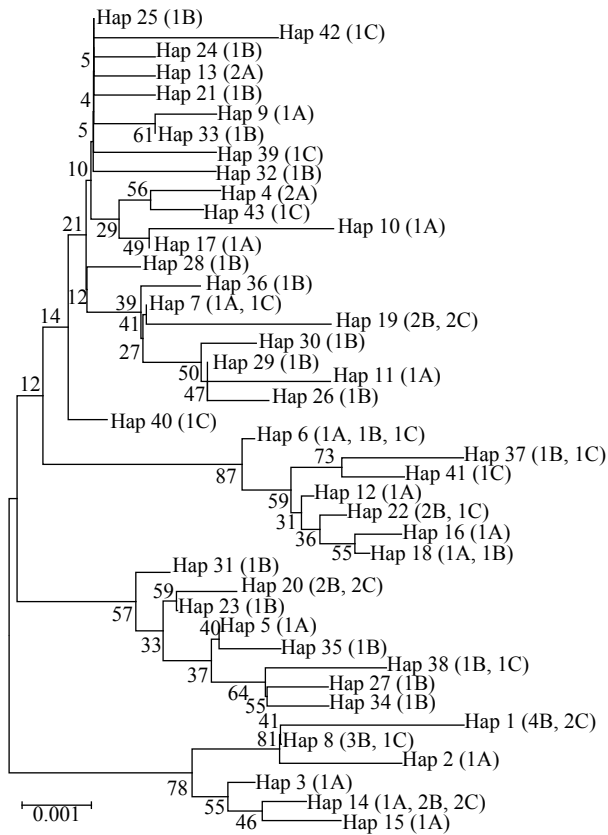


图 2 基于CO I 基因片段的NJ系统进化树

Fig. 2 The construction of phylogenetic trees based on Neighbour-Joining (NJ) method for *T. lepturus*

(*G_{st}*)、固定系数(*F_{st}*)的范围分别-0.01672—(-0.1032)、-0.03144—(-0.02283), 均值分别为-0.01399、-0.02683; 总群体的Tajima's *D*检测为负值, 不显著(0.10>*P*>0.05)。

3 讨论

3.1 线粒体CO I 和16S rRNA基因片段序列比较分析

碱基组成分析表明, 带鱼CO I 和16S rRNA基因片段的A+T含量均微高于G+C含量, 符合硬骨鱼

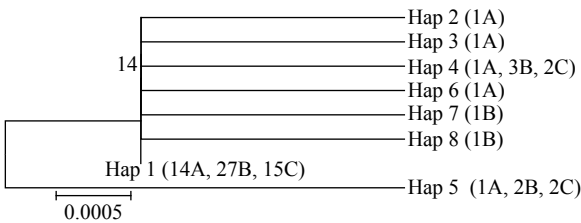


图 3 基于16S rRNA基因片段的NJ系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *T. lepturus*

相应序列特征, 与蒙子宁^[22]、李鹏飞等^[23]、肖永双^[24]研究结果基本一致。本研究的带鱼群体CO I 基因序列共检测出49个变异位点, 占比对位点的4.34%, 变异程度高于16S rRNA基因序列检测到的8个变异位点(1.44%), 这多是由于海洋动物线粒体DNA不同区域核苷酸的突变速率或不同基因片段的选择压力不同, 使得线粒体不同片段的核苷酸序列存在差异^[25]。

3.2 遗传多样性分析

3个带鱼群体的CO I 和16S rRNA基因片段的单倍型多样性(*H_d*)、平均核苷酸差异数(*K*)、核苷酸多样性指数(*P_i*)分别为0.97692和0.38772、5.96088和0.55595、0.00528和0.00101。蒙子宁^[22]基于线粒体DNA 16S rRNA标记(500 bp)对黄海带鱼(*n*=12)多样性检测分析, 结果显示, 只检测到3个单倍型, 遗传距离(*D*)为0.001, 单倍型多样性指数(*H_d*)为0.25, 核苷酸多样性指数(*π*)是0.00068; 李鹏飞等^[23]对浙江近海水域带鱼群体(*n*=15)线粒体CO I 基因序列(609 bp)变异分析, 发现15个序列中有10个单倍型, 转换/颠换率为5.5, 核苷酸多样性指数(*π*)为0.00513。本实验对比于蒙子宁^[22]、李鹏飞等^[23]所得的遗传距离以及核苷酸多样性指数相差无几, 平均核苷酸多样性差异略高, 推测可能由于两研究的试验样品数量不多。肖永双^[24]对带鱼3个地理群体[南海(*n*=20)、温州(*n*=20)、北海(*n*=14)]的D-loop区

序列(556 bp)测序分析,在54个个体中检测到40个单倍型,单倍型多样性指数(H_d)和核苷酸多样性指数(P_i)分别为 0.98 ± 0.01 和 0.008 ± 0.005 ;郑文娟等^[12]研究舟山海域带鱼($n=54$)线粒体DNA D-loop区序列(527 bp),共检测到44个单倍型,单倍型多样性指数(H_d)是0.991,核苷酸多样性指数(P_i)为0.012。肖永双^[24]、郑文娟等^[12]得出的群体单倍型指数(H_d)和核苷酸多样性指数(P_i)均明显高于本实验,主要是由于线粒体D-loop区进化速率高于线粒体DNA CO I 基因序列和16S rRNA基因序列。

如表6所示,与中国近海其他常见鱼类相比,基于CO I 基因东海带鱼群体单倍型多样性以及核苷酸多样性水平较高。鉴于一般海洋鱼类线粒体

遗传信息单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性指数(P_i)分别处于0.11—1.00、0.0008—0.0320^[32],基于16S rRNA基因分析,东海带鱼群体属于低单倍型、低核苷酸多样性($H_d < 0.5$, $P_i < 0.005$),基于CO I 基因带鱼群体单倍型较高,核苷酸多样性仍较低,综合单倍型多样性(H_d)、平均遗传距离(D)、群体遗传多样性指数(P_i)等参数,基于线粒体CO I 和16S

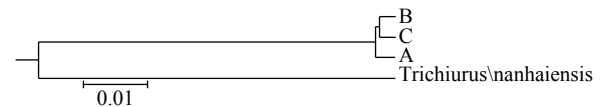


图4 基于CO I 基因序列带鱼群体间UPMGA系统树

Fig. 4 Construction of a distance tree with the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) among populations of *T. lepturus* based on CO I gene sequences

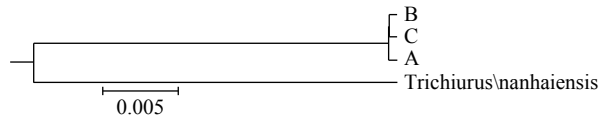


图5 基于16S rRNA基因序列带鱼群体间UPMGA系统树

Fig. 5 UPGMA phylogenetic tree among populations of *T. lepturus* based on 16S rRNA sequences

表4 带鱼群体间和群体内平均遗传距离

Tab. 4 Genetic distances among and within populations of *T. lepturus*

群体 Populations	A	B	群体内 Intraspecific
A			0.0063/0.0011/ 0.0079
B	0.0058/0.0010/ 0.0072		0.0046/0.0009/ 0.0060
C	0.0061/0.0011/ 0.0084	0.0048/0.0010/ 0.0057	0.0051/0.0011/ 0.7012

表5 带鱼群体遗传分化系数 G_{st} (上三角)与固定系数 F_{st} (下三角)

Tab. 5 G_{st} values (above the diagonal) and F_{st} values (below the diagonal) among populations of *T. lepturus*

群体 Population	A	B	C
A		0.00471/-0.01032	0.00188/-0.01672
B	0.06544/-0.02283		-0.00787/-0.01494
C	0.05361/-0.02623	-0.00750/-0.03144	

注: 斜线左侧为CO I 参数, 右侧为16S rRNA参数

Note: left slash for CO I parameter, right slash for 16S rRNA parameter

表6 海洋鱼类CO I 基因遗传多样性

Tab. 6 The genetic diversity of marine fish in CO I gene

种类 Species	基因区域 Gene region	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	参考文献 Reference
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	CO I	0.915	0.00412	陈淑吟等 ^[26]
小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	CO I	0.912 $\pm$ 0.020	0.00430 $\pm$ 0.00032	王肇霖 ^[27]
日本黄姑鱼 <i>Nibea japonica</i>	CO I	0.642	0.003	Chai等 ^[28]
鲞状黄姑鱼 <i>N. miichthioides</i>	CO I	0.584	0.002	Chai等 ^[28]
鲳鱼 <i>Pampus argenteus</i>	CO I	0.571	0.004	彭士明等 ^[29]
四指马鲛属 <i>Eleutheronoma</i>	CO I	0.6486 $\pm$ 0.1023	0.000407 $\pm$ 0.001673	邓春兴 ^[30]
蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	CO I	0.792 $\pm$ 0.089	0.0027 $\pm$ 0.0027	曹艳等 ^[31]
东海带鱼 <i>Trichiurus lepturus</i>	CO I	0.97692	0.00528	本实验研究

rRNA基因发现东海带鱼遗传多样性水平不高。

3.3 群体间遗传结构

鉴于Shaklee等^[33]提出的鱼类在属、种和种群三级水平上遗传距离分别是0.9、0.30和0.05的分类依据, 3个带鱼群体间均未达到种群的分化标准。3个带鱼群体与南海带鱼的CO I 和16S rRNA基因序列的遗传距离分别0.11412和0.04907, 结果显示CO I 基因能够较好地区分东海带鱼和南海带鱼, 而线粒体16S rRNA基因序列标记则未能区分。

基于CO I 基因片段, 群体B与群体C之间的遗传分化系数(F_{st})出现负值, 说明群体B与群体C内部差异大于群体间差异, 群体B与群体C之间未发生遗传分化, 推测可能由于2个群体是随机交配的群体, 群体B虽处于闽东渔场, 但距离群体C(温台渔场)较近, 且群体B与群体C均处于东海带鱼索饵场与越冬场重叠区内^[34], 两群体间交流较为频繁造成。基于16S rRNA基因片段, 群体间的遗传分化系数均为负值, 推测可能由于3个带鱼群体的线粒体16S rRNA基因序列较为保守、变异率低, 群体间分化程度较低导致。郑文娟等^[12]、肖永双^[24]分析带鱼群体线粒体控制区遗传多样性也得到群体间遗传分化系数为负值的结果。基于2个基因片段各群体遗传参数比较, 群体A在3个群体中遗传学背景最为丰富, 群体B遗传最稳定, 主要原因可能是群体A处于舟山渔场, 距离东海中部外侧中心越冬场较近, 且每年春季, 东海南部越冬带鱼群体向东北方向洄游至舟山渔场产卵, 是不同带鱼群体的交汇区域。带鱼分布广泛、长距离迁移能力强, 产卵、索饵、越冬均产生洄游, 一定程度上会缩小了群体间的差异。此外, 东海带鱼属于多次性产卵类型、鱼卵具有漂浮型, 产卵期间可排卵2—3次, 一般第1次与第2次排卵时间间隔约1个月^[35], 这为带鱼群体间基因交流提供了时间和空间上的便利, 造成群体间遗传分化程度不显著。

东海带鱼渔获量一直位于我国海洋捕捞鱼类首位, 因带鱼资源被过度开发, 产量急剧下降。随着执行伏季休渔制度、启动东海带鱼国家级水产种质资源保护区、开展“一打三整治”工作、引进TAC及ITQ制度等一系列措施的实施, 东海带鱼产量逐渐稳定在年产 8×10^8 kg, 但根据东海区渔业资源动态监控网浙江站近年(2012—2015年)渔业资源动态调查监控资料来看^[36], 东海带鱼资源量波动剧烈, 远未恢复到常年水平。故而, 在今后带鱼的资源管理和利用中, 继续以保护带鱼群体的遗传资源为中心, 合理控制捕捞力度, 避免人为基因渗透导致带鱼群体遗传多样性的丢失, 实现带鱼种质资源

的可持续利用。除此之外, 采用其他分子技术或选择DNA其他基因区域获取多组序列数据进行全面评估东海带鱼群体的遗传多样性水平以及开展人工繁育等研究对于带鱼资源的持续利用也尤为重要。

参考文献:

- [1] Byrne M, Rowe F, Uthicke S. Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotrida: Holothuroidea) based on CO I and 16S mitochondrial DNA [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, **56**(3): 1061—1081
- [2] Yuan T, He M X, Huang L M. Intraspecific genetic variation in mitochondrial 16S rRNA and CO I genes in domestic and wild populations of Huaguizhikong scallop *Chlamys nobilis* Reeve [J]. *Aquaculture*, 2009, **289** (1—2): 19—25
- [3] Xin J, Zhang Y R, Xu D D, et al. Molecular phylogeny of species *Nibea* in 16S rRNA and cytochrome oxidase submit I mitochondrial genes [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, **45**(2): 307—313 [辛俭, 张玉荣, 徐冬冬, 等. 基于线粒体16S rRNA和CO I 基因探讨中国近海黄姑鱼类的分子系统进化关系. 海洋与湖沼, 2014, **45**(2): 307—313]
- [4] Zhang D N, Zheng L M, He J R, et al. DNA barcoding of hydromedusae in northern Beibu Gulf for species identification [J]. *Biodiversity Science*, 2015, **23**(1): 50—60 [张钊妮, 郑连明, 何劲儒, 等. 基于线粒体CO I 和16S片段序列的北部湾北部水螅水母DNA条形码分析. 生物多样性, 2015, **23**(1): 50—60]
- [5] Sung Y H, Hu P, Wang J, et al. A new species of *Amolops* (Anura: Ranidae) from southern China [J]. *Zootaxa*, 2016, **4170**(3): 525—538
- [6] Satoh T P, Miya M, Mabuchi K, et al. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes [J]. *BMC Genomics*, 2016, **17**(1): 719
- [7] Weng Z H, Xie Y J, Xiao Z Q, et al. Molecular identification of the taxonomic status of *Sinonovacula rivularis* and genus *Sinonovacula* using mitochondrial CO I and 16S rRNA fragments [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(4): 684—690 [翁朝红, 谢仰杰, 肖志群, 等. 线粒体CO I 和16S rRNA片段确定近江蛏和缢蛏属的分类地位. 水生生物学报, 2013, **37**(4): 684—690]
- [8] Zhao H Q. Studies on the feeding habits of *Trichiurus lepturus* in East China Sea [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University. 2014 [赵洪强. 东海带鱼食性研究. 舟山: 浙江海洋大学. 2014]
- [9] Zhang K, Chen Z Z. Using Bayesian state-space model to assess *Trichiurus japonicus* stock in the East China Sea [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, **22**(5): 1015—1026 [张魁, 陈作志. 应用贝叶斯状态空间建模对东海带鱼的资源评估. 中国水产科学, 2015, **22**(5): 1015—1026]

- [10] Chai X J, Zhu Y H, Wang Y B, *et al.* Study on the Embryonic development of *Trichiurus lepturus* in the East China Sea [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 2015, **34**(5): 429—432 [柴学军, 朱云海, 王跃斌, 等. 东海带鱼的胚胎发育研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2015, **34**(5): 429—432]
- [11] Wang Y, Xu H X. Dynamic analysis on *Trichiurus japonicus* resources in summer closed fishing system in East China Sea [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 2009, **28**(4): 384—388 [王珪, 徐汉祥. 伏季休渔制度下东海区带鱼资源动态分析. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2009, **28**(4): 384—388]
- [12] Zheng W J, Du Y C, Lin J, *et al.* Genetic diversity analysis of *Trichiurus lepturus* in Zhoushan based on mitochondrial and D-loop region partial sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(2): 408—423 [郑文娟, 杜一超, 林洁, 等. 基于线粒体DNA D-loop区部分序列分析舟山海域带鱼种群遗传结构. 水生生物学报, 2015, **39**(2): 408—423]
- [13] Liu Y, Cui Z. The complete mitochondrial genome sequence of the cutlassfish *Trichiurus japonicus* (Perciformes: Trichiuridae): genome characterization and phylogenetic considerations [J]. *Marine Genomics*, 2009, **2**(2): 133—142
- [14] Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2007, **402**: 35—60
- [15] Kessing B, Croom H, Martin A, *et al.* The simple fool's guide to PCR [M]. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu. 1989, 1—23
- [16] Clark M J, Chen R, Lam H Y, *et al.* Performance comparison of exome DNA sequencing technologies [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(10): 908—914
- [17] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, **41**: 95—98
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**(11): 1451—1452
- [19] Tajima F. The effect of change in population size on DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 597—601
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2011, **28**(10): 2731—2739
- [21] Liu X, Guo Y, Wang Z, *et al.* The complete mitochondrial genome sequence of *Trichiurus nanhaiensis* (Perciformes: Trichiuridae) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2013, **24**(5): 516—517
- [22] Meng Z N. The genetic diversity in *Pseudosciaena polyactis*, *Trichiurus lepturus*, *Eupleurogrammus muticus* and the molecular phylogeny of eight Sciaenoid species in the neritic waters of China [D]. Xiamen: Xiamen University. 2003 [蒙子宁. 中国近海小黄鱼、带鱼和小带鱼的遗传多样性以及八种石首鱼类的分子系统进化. 厦门大学, 厦门. 2003]
- [23] Li P F, Zhu W B, He Z T, *et al.* DNA barcoding construction and genetic diversity revealed by mtDNA CO I of *Trichiurus lepturus* in the East China sea [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 2013, **32**(1): 6—9 [李鹏飞, 朱文斌, 贺舟挺, 等. 东海带鱼DNA条形码的建立及CO I 序列变异分析. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2013, **32**(1): 6—9]
- [24] Xiao Y S. Molecular Phylogeography of Six Marine Fishes in the Northwestern Pacific [D]. Ocean University of China, Qingdao. 2011 [肖永双. 西北太平洋五种海洋鱼类的分子系统地理学研究. 中国海洋大学, 青岛. 2011]
- [25] Teletchea F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2009, **19**(3): 265—293
- [26] Chen S Y, Xu S X, Zhang Z Y, *et al.* Study of genetic diversity of wild and culture populations of *Pseudosciaena crocea* using two molecular markers [J]. *Marine Sciences*, 2011, **35**(12): 82—87 [陈淑吟, 徐士霞, 张志勇, 等. 大黄鱼野生群体与养殖群体遗传多样性研究. 海洋科学, 2011, **35**(12): 82—87]
- [27] Wang Z L. Study on the morphology and germplasm resource divergence of different geographical groups of small yellow croaker [D]. Zhejiang Ocean University. Zhoushan. 2016 [王肇霖. 不同地理群体小黄鱼形态和种质资源差异研究. 浙江海洋大学, 舟山. 2016]
- [28] Chai X J, Hu Z H, Wang Y B, *et al.* Genetic diversity and the relationship of *Nibea japonica* and *Nibea miichthioides* using mitochondrial DNA gene [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, **48**(2): 274—280
- [29] Peng S M, Shi Z H, Hou J L. Comparative analysis on the genetic diversity of cultured and wild silver pomfret populations based on mtD-loop and CO I gene [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, **34**(1): 19—25 [彭士明, 施兆鸿, 侯俊利. 基于线粒体D-loop区与CO I 基因序列比较分析养殖与野生银鲷群体遗传多样性. 水产学报, 2010, **34**(1): 19—25]
- [30] Deng C X. Genetic diversity of *Eleutheronema* on the East and South China Seas based on mitochondrial CO I gene sequences analysis [D]. Jinan University. Guangzhou. 2014 [邓春兴. 基于CO I 基因序列的中国东南沿海四指马鲛属鱼类的遗传多样性分析. 暨南大学, 广州. 2014]
- [31] Cao Y, Zhang Q, Gong Y Y, *et al.* Genetic variation of *Scomberomorus niphonius* in the coastal waters of China based on mtDNA CO I sequences [J]. *Marine Fisheries*, 2015, **37**(6): 485—493 [曹艳, 章群, 宫亚运, 等. 基于线

- 粒体CO I 序列的中国沿海蓝点马鲛遗传多样性. 海洋渔业, 2015, **37**(6): 485—493]
- [32] Grant W S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *Journal of Heredity*, 1998, **89**(5): 415—426
- [33] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the eletrophoretic analysis of protein [J]. *Pacific Science*, 1982, **36**(2): 141—157
- [34] Xu Z L, Chen J J. Migratory routes of *Trichiurus lepturus* in the East China Sea, Yellow Sea and Bohai Sea [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(6): 824—835 [徐兆礼, 陈佳杰. 东、黄渤海带鱼的洄游路线. 水产学报, 2015, **39**(6): 824—835]
- [35] Li C H. Annual ovarian changes of *Trichiurus haumela* in the East China Sea [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1982, **13**(5): 461—472 [李城华. 东海带鱼的生物学 I. 卵巢周年变化的初步研究. 海洋与湖沼, 1982, **13**(5): 461—472]
- [36] Resource room of Zhejiang Marine Fisheries Research Institute. The dynamic analysis of marine fishery resources in Zhejiang in the first half of 2015[DB/OL]. <http://www.zjhys.cn/news/hydt/20159/1111331020951901.html>, 2015-09-11/2016-08-15 [浙江省海洋水产研究所资源室. 2015年上半年浙江海洋渔业资源动态评析. <http://www.zjhys.cn/news/hydt/20159/1111331020951901.html>, 2015-09-11/2016-08-15]

A COMPARATIVE ANALYSIS ON THE GENETIC DIVERSITY OF *TRICHIURUS LEPTURUS*

BIAN Guang-Ming^{1,2}, WANG Na-Ling¹, HU Ze-Hui¹, WANG Yue-Bin¹, HU Cheng-Shuo¹ and CHAI Xue-Jun¹

(1. Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Marine and Fisheries Institute of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Mariculture & Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021; 2. Changdang Township Agricultural Technology Extension and Service Center of Sheyang Country, Yancheng 224322, China)

Abstract: A single gene fragment and combined nucleotide sequences for two gene fragments of mitochondrial DNA (mtDNA), which were 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and cytochrome oxidase c subunit 1 (CO I), were analyzed for three populations of *Trichiurus lepturus* (*T. lepturus*, designated by A, B, and C). The length of 16S rRNA gene of mtDNA and CO I was 1130 and 554 bp, respectively. These two gene fragments were combined together to form a gene fragment with the length of 1684 bp for the purpose of subsequent genetic diversity analysis. The average contents of nucleotides T, C, A, and G were 29.0%, 28.9%, 24.4% and 17.7%, respectively in the mtDNA CO I gene, while those mean contents were 22.7%, 27.6%, 28.0% and 21.7% respectively in 16S rRNA gene. In this study, 43, 8, and 49 haplotypes were defined in 72 individuals by using single and combined gene fragments, in which haplotypes were shared among the mentioned populations. The diversities of haplotypes varied between 0.9766 and 0.9992, indicating that the abundance of haplotypes was within different populations. The nucleotide differences and the nucleotide diversity in each population were in the ranges of 5.111—9.024 and 0.0045—0.0076, respectively. Genetic distances among the populations varied from 0.0048 to 0.00084. These results indicated that genetic diversity in three populations of *T. lepturus* was considerable. The construction of phylogenetic trees based on Neighbour-Joining (NJ) method showed that several individuals in the same population were aggregated. The achieved findings also indicated that high frequency of gene transfer among different populations resulted in low genetic differentiation. Population A contained richer genetic background than that of populations B and C. The difference within different populations was higher compared to among various populations. It could be concluded that the three mentioned populations of *T. lepturus* had low genetic diversity based on single and combined mtDNA genes.

Key words: *Trichiurus lepturus*; CO I; 16S rRNA; Genetic diversity