

基于形态学特征和线粒体 *Cyt b* 序列的横带髯鲷野生与养殖群体比较刘灏宇¹, 宋日雨¹, 郑昀亚¹, 冯琳晓¹, 刘璐², 杨天燕¹, 高天翔^{1*}

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316022; 2. 山东交通学院船舶与港口工程学院, 山东威海 264200)

摘要 对横带髯鲷形态特征以及野生群体和养殖群体的遗传差异进行了分析。共测定 94 尾横带髯鲷的 19 项生物学特征。结果表明, 野生群体和养殖群体间形态差异不明显。同时, 扩增了野生群体和养殖群体的线粒体 *Cyt b* 基因片段, 22 尾横带髯鲷个体共检测到 5 种单倍型, 其中养殖群体仅有 1 种单倍型, 野生群体具有 5 种单倍型, 且养殖群体的单倍型多样性及核苷酸多样性均低于野生群体。基于横带髯鲷线粒体 *Cyt b* 片段构建的单倍型网络图及系统发育树未发现该物种存在明显的谱系结构。综上所述, 相较于野生群体, 横带髯鲷养殖群体的遗传多样性水平较低, 因此有必要采取科学的人工繁育技术与方法, 提高养殖群体的遗传多样性水平, 以保护横带髯鲷的种质资源。

关键词 横带髯鲷; 形态学; *Cyt b* 基因; 野生群体; 养殖群体

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)05-0070-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.05.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparison between Cultured and Wild Populations of *Haplozenys analis* Based on Morphological Characteristics and Mitochondrial DNA *Cyt b*

LIU Hao-yu, SONG Ri-yu, ZHENG Yun-ya et al (Fisheries College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract The morphological characteristics of *H. analis* and genetic differences between wild and cultured populations were analyzed. 19 biological characteristics of 94 tails of *H. analis* were determined. The results showed that there was no significant morphological difference between wild population and cultured population. At the same time, *Cyt b* fragments of mitochondrial DNA in wild and cultured populations were amplified. A total of 5 kinds of haplotypes were detected in 22 individuals, only 1 kind of haplotype was found in the cultured population, 5 kinds of haplotypes were found in the wild population. The haplotype diversity and nucleotide diversity in the cultured population were lower than those in the wild population. The haplotype network diagram and phylogenetic tree based on mitochondrial *Cyt b* fragment of *H. analis* did not reveal significant pedigree structure of the species. In conclusion, compared with the wild population, the level of genetic diversity of *H. analis* was significantly lower. It was necessary to adopt scientific artificial breeding techniques and methods to improve the genetic diversity and protect the germplasm resources of *H. analis*.

Key words *Haplozenys analis*; Morphology; *Cyt b* gene; Wild population; Cultured population

横带髯鲷(*Haplozenys analis*), 俗称十六枚、海猴, 隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes) 鲈形目(Perciforms) 石鲈科(Pomadouridae) 髯鲷属(*Haplozenys*)^[1], 主要生活在温带、亚热带海域。它以小型鱼类及甲壳类为食, 是常见于礁区海域的底栖鱼种, 其肉质鲜美、体色鲜艳, 不仅具有食用价值, 而且也是名贵的海水观赏鱼类, 是我国重要的经济鱼类之一^[2]。由于横带髯鲷的野生资源总量偏少, 捕捞量不大, 近年来我国东南沿海多地已开展了横带髯鲷的人工育苗及海水养殖^[3-4], 横带髯鲷已成为海水养殖鱼类中非常具有发展潜力的品种。

尽管横带髯鲷具有较高的经济价值, 但关于该物种的研究鲜有报道。目前, 关于横带髯鲷的研究多集中在育苗及养殖方面^[1, 3-5], 而有关基础研究相对较少^[6-8], 其群体遗传多样性研究近乎空白。王世峰等^[9]采用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术评估了厦门近海该物种野生群体的遗传多样性, 但尚未有关于该物种养殖群体的遗传多样性研究。养殖群体的遗传多样性状况会影响养殖品种的种质质量, 倘若开展相关的增殖放流工作会对该物种野生群体产生一定影响。因此, 有必要对横带髯鲷养殖及野生群体的遗传多样性开展研究。

笔者通过对横带髯鲷养殖群体和野生群体的形态学特征及 DNA 条形码进行比较分析, 研究 2 个群体的形态和遗传差异, 旨在为横带髯鲷渔业资源的可持续利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集 横带髯鲷来自舟山近海海域, 共 94 尾。其中, 野生群体 64 尾, 养殖群体 30 尾。形态学测定后, 取鳃盖后缘侧线上方肌肉进行 DNA 提取。

1.2 形态学测量 对横带髯鲷进行形态学测量, 包括该物种的可量性状和可数性状, 其中体长测量工具为精确度 1 mm 的量鱼板; 体重测量工具为精确度 0.01 g 的电子秤; 其余长度测量使用精确度 0.02 mm 的游标卡尺。对所有个体均测量以下可数、可量性状: 第一背鳍鳍条数、第二背鳍鳍条数、胸鳍鳍条数、腹鳍鳍条数、臀鳍鳍条数、尾鳍鳍条数、体重、全长、体长、体高、头长、体宽、尾柄长、尾柄高、吻长、眼径、眼间距、眼后头长, 在此基础上计算 19 项可量性状比。

1.3 DNA 提取 采用常用酚试剂 DNA 提取法, 每个样本剪取约 4 mm×4 mm 的肌肉, 剪碎放入离心管中, 加入 600 μL DNA 裂解液、10 μL 蛋白酶 K 在 50 °C 下烘干至肌肉完全溶解。向离心管中加入 500 μL Tris 饱和酚, 10 min 摇匀后, 12 000 r/min, 4 °C 下离心 7 min; 离心结束后液体分层, 吸取上层 DNA 溶液置于新离心管中, 加入混合试剂[Tris 饱和酚混合液: 氯仿: 异戊醇=25:24:1(体积比)], 10 min 摇匀后以相同离心模式离心; 继续吸取上层清液, 并加入 400 μL 混合

基金项目 国家级大学生创新创业训练计划项目(201910340010); 浙江省重点研发计划项目(2021C02047)。

作者简介 刘灏宇(2000—), 男, 山西长治人, 从事海洋资源与环境研究。*通信作者, 教授, 从事渔业资源生物学研究。

收稿日期 2022-04-11

试剂[氯仿:异戊醇=24:1(体积比)],继续以相同离心模式离心;吸取上层清液,进行无水乙醇沉淀和75%乙醇洗涤,最后经24 h风干后加入超纯水100 μ L,通过离心获得DNA提取产物,4 $^{\circ}$ C下保存备用。

1.4 PCR扩增及产物测序 扩增横带髯鲷 *Cyt b* 基因全长序列,所用引物为 *Cyt b*-1F(CCCAGCATCA ACCCTAAG)、*Cyt b*-1R(GGTGGCGTTACTACTGAA),*Cyt b*-2F(GGTCATCCTACTTCTTCTGT)、*Cyt b*-2R(GGATGGCGTAAGCGAA-TA)。PCR预混体系参考杨天燕等^[10]的方法,PCR扩增反应条件参照俞正森等^[11]的方法,PCR扩增反应使用PCR扩增仪(Bio-Rad T100,美国伯乐)进行。反应结束以后,经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测(温度为常温,电压为5 V,电泳缓冲液为5%TAE)和凝胶成像观察,将扩增产物送至上海美吉生物有限公司进行纯化和双向测序。

1.5 数据处理及分析 将测序获得的全部DNA序列利用DNAStar软件包(DNA Star, Inc. Madison, USA)中的SeqMan

软件进行校正与拼接,并剪去序列上的载体序列。利用Arlequin软件^[12]计算序列碱基含量百分比、单倍型及多态位点数量、转换/颠换比、单倍型多样性、核苷酸多样性,并进行Tajima'*D*和Fu's *F_s*中性检验。根据单倍型频率分布,构建横带髯鲷单倍型网络图;使用MEGA 5.0软件根据*Cyt b*片段构建横带髯鲷群体间的系统发育树,并计算群体间和群体内的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 形态学特征 养殖和野生群体横带髯鲷的可量性状比见表1。养殖及野生群体体型无明显差异,均呈扁平方形,背呈拱形隆起,第一背鳍具多条鳍棘,腹部略呈浅弧形,身体侧面5条浅白色带与6条深棕色带相间,腹部浅褐色,无颌须。此外,其背鳍第三棘与臀鳍第二棘较为发达,背鳍、臀鳍软条部及尾鳍为鲜黄色并具黑缘,尾鳍圆形;耳石为透明度极低的盾形;根据可数性状得到鳍式如下:D. XI, 14~18; A. III. 8~10; V. I-5; P. 14~20; C. 17~21。

表1 养殖和野生群体横带髯鲷的可量性状比

Table 1 The measurable character ratio of *H. analis* in cultured and wild populations

序号 No.	可量性状比 Measurable character ratio	养殖群体 Cultured population			野生群体 Wild population		
		最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Average	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Average
1	全长/体长	1.35	1.21	1.27	1.22	1.35	1.27
2	体长/体高	2.28	1.76	2.02	1.79	2.19	2.04
3	体长/头长	3.12	2.52	2.72	2.56	2.95	2.72
4	体宽/体长	0.20	0.12	0.17	0.12	0.20	0.17
5	尾柄长/体长	0.18	0.09	0.13	0.09	0.15	0.12
6	体长/尾柄长	10.97	5.70	7.95	6.57	10.97	8.19
7	体长/尾柄高	9.00	7.13	8.08	7.18	8.82	8.09
8	体高/体宽	4.47	2.50	2.96	2.50	4.47	2.89
9	尾柄长/尾柄高	1.42	0.73	1.03	0.73	1.30	1.00
10	头长/体长	0.40	0.32	0.37	0.34	0.39	0.37
11	头长/吻长	3.83	2.37	3.05	2.48	3.83	3.08
12	头长/眼径	3.71	2.51	3.26	2.82	3.71	3.27
13	眼径/头长	0.40	0.27	0.31	0.27	0.35	0.31
14	头长/眼间距	5.02	2.92	4.05	2.92	5.01	4.05
15	眼间距/头长	0.34	0.20	0.25	0.20	0.34	0.25
16	头长/尾柄长	3.89	2.20	2.93	2.38	3.89	3.02
17	头长/尾柄高	3.30	2.43	2.98	2.43	3.30	2.98
18	头长/眼后头长	2.95	1.93	2.48	2.01	2.89	2.50
19	眼后头长/头长	0.52	0.34	0.41	0.35	0.50	0.40

2.2 基于 *Cyt b* 序列片段的群体遗传结构及多样性分析 对9尾野生横带髯鲷和13尾养殖横带髯鲷的 *Cyt b* 基因序列进行双向测序,共获得22条长度503 bp的 *Cyt b* 基因片段,其中养殖群体编号AH1~AH13,野生群体编号A1~A9。该研究采集的横带髯鲷野生群体与养殖群体线粒体 *Cyt b* 序列碱基含量差异较小,其中A+T含量均略高于C+G含量。

基于横带髯鲷 *Cyt b* 序列片段构建的单倍型网络图如图1所示,其结构简单,没有发现明显的谱系结构。22尾横带髯鲷个体共检测到4个多态位点,检测到5种单倍型(表2)。

其中,养殖群体只检测到1种单倍型,遗传差异较小且不存在变异序列;野生群体检测到5种单倍型,且野生群体与养殖群体间有1种共同的单倍型,转换位点2个,颠换位点2个,转换/颠换比为1:1。养殖群体单倍型多样性和核苷酸多样性均为0;野生群体的单倍型多样性为(0.8056 \pm 0.1196),核苷酸多样性为(0.0023 \pm 0.0019),均高于养殖群体(表3)。对横带髯鲷野生群体的中性检验显示:Tajima'*D*值(Tajima'*D*=-0.84257, *P*>0.05)与Fu's *F_s*值(Fu's *F_s*=-2.10915, *P*<0.05)均为负值,根据中性检验原理,证实该野生群体的扩张。

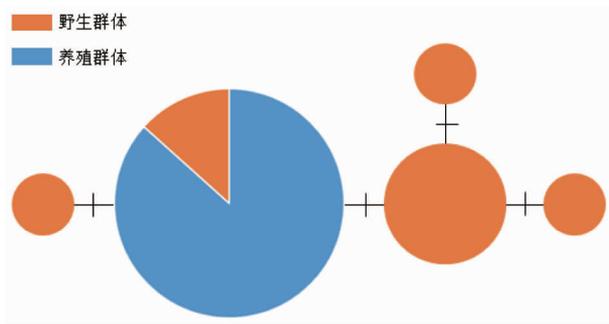


图1 基于线粒体 *Cyt b* 基因片段构建的横带髯鲷单倍型网络图
Fig.1 Haplotype network diagram of *H. analis* based on mitochondrial *Cyt b* sequence

采用邻接法利用 22 尾横带髯鲷 *Cyt b* 片段序列构建系

统发育树,结果表明在该系统树上明显分为 2 个组群(图 2)。其中,野生群体的 A4、A6、A9 与养殖群体的所有个体先聚为一支,野生群体其余个体聚为另一支,2 个组群间的平均遗传距离为 0.000 2,养殖群体内各个体间没有遗传差异,野生群体内各个体的平均遗传距离为 0.002 0(0.000 0~0.006 0)。

表 2 横带髯鲷各群体单倍型数量统计

Table 2 Statistics of haplotypes in each population of *H. analis*

单位:尾

类型 Type	单倍型 Haplotype				
	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5
养殖群体 Cultured population	13	0	0	0	0
野生群体 Wild population	2	4	1	1	1

表 3 不同群体横带髯鲷的遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity index of different population of *H. analis*

群体 Population	样品数量 Sample number//尾	单倍型数量 Haplotype number//种	多态位点数量 Numbers of poly- morphic sites//个	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
养殖群体 Cultured population	13	1	0	0	0
野生群体 Wild population	9	5	4	0.805 6±0.119 6	0.002 3±0.001 9

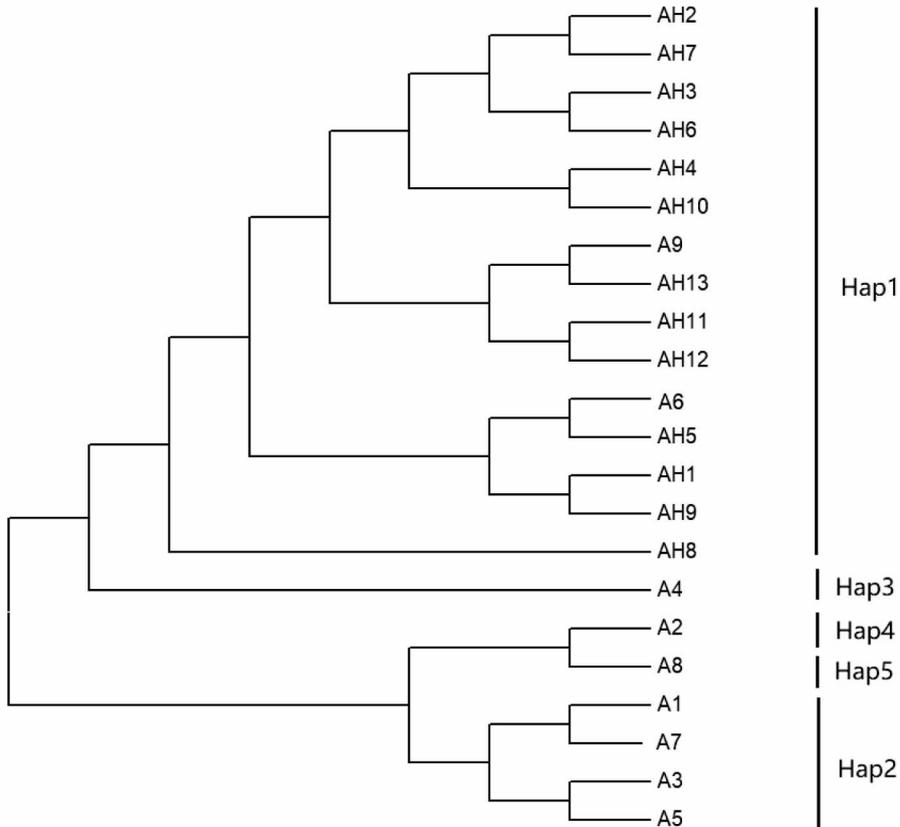


图 2 采用邻接法基于 *Cyt b* 序列构建的横带髯鲷各群体间系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *H. analis* based on *Cyt b* sequences by using neighbor-joining method

3 讨论

在鱼类学研究中,形态学研究是最基本且最主要的方法之一,是生物分类学的主要依据^[13-14]。该研究采用鱼类传统形态学方法,测量了横带髯鲷养殖群体和野生群体的可数、

可量性状,并对 2 个群体进行比较分析,探讨 2 个群体存在的差异。结果显示,横带髯鲷野生与养殖群体在形态特征方面差异不明显,尚未出现遗传性状分化的现象。

迄今为止,还没有针对横带髯鲷野生和养殖群体遗传学

方面的比较研究。王世峰等^[9]关于评估厦门近海横带髯鲷野生群体的遗传多样性研究表明,该群体具有较高的遗传多样性,但未与养殖群体进行比较。近年来,线粒体 *Cyt b* 基因因其进化速度适中、变异率相对较高等特点,已被用于多种鱼类的种内群体间的比较研究^[15-16]。该研究横带髯鲷线粒体 *Cyt b* 片段测序结果显示,野生横带髯鲷的单倍型多样性为(0.805 6±0.119 6),核苷酸多样性为(0.002 3±0.001 9),均高于养殖群体。据推测,在人工繁育过程中发生的近亲繁殖、亲本数量减少以及遗传漂变等现象可能是导致该物种养殖群体遗传多样性较低的原因^[17-18]。此外,较高水平的物种多样性有助于提高该物种的环境适应及生存能力^[19]。该研究结果也表明,更能适应外界环境变化的野生群体比养殖群体有更高的遗传多样性。养殖群体的遗传多样性低于野生群体的现象在其他鱼类研究中也都有所报道。宋娜等^[20]通过对香鱼野生与养殖群体进行比较发现,该物种养殖群体单倍型多样性与核苷酸多样性均低于野生群体;赵祥等^[21]通过对黄姑鱼 2 个养殖群体及 5 个野生群体的线粒体控制区序列进行比较,发现养殖群体单倍型多样性与核苷酸多样性均低于野生群体。从横带髯鲷的群体单倍型分布来看,养殖群体单倍型单一,结合线粒体 DNA 遵循母系遗传的特点,推测可能是因该物种人工繁育过程中所用亲鱼数目较少所致。

4 结论

横带髯鲷野生群体与养殖群体在形态学上差异不明显。在遗传学方面,与横带髯鲷野生群体相比,养殖群体遗传多样性较低。在今后的横带髯鲷人工繁育工作中,应保证足够的野生横带髯鲷亲本数量,以确保养殖群体的遗传多样性维持在一个较高的水平。同时,应保证今后用于增殖放流的苗种群体遗传学监测,以减轻增殖放流对野生横带髯鲷资源的遗传学影响,实现横带髯鲷野外资源的可持续利用。

参考文献

- [1] 许文军,辛剑,张学舒,等. 横带髯鲷 *Hapalogeny mucronatus* (Eyedoux et Souleyet) 白点虫病的防治研究[J]. 现代渔业信息, 2002, 17(11): 24-25, 13.
- [2] 徐田军,王健鑫,孙悦娜,等. 基于髯鲷属鱼类 *Cyt b* 基因全序列探讨髯鲷属在鲈总科的分类地位[J]. 动物分类学报, 2010, 35(3): 530-536.
- [3] 史海东,毛国民,王海岳. 温度和盐度对横带髯鲷胚胎发育的影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(3): 230-234.
- [4] 姚海富,毛国民,史海东. 横带髯鲷 *Hapalogenys mucronatus* (Eyedoux et Souleyet) 亲鱼培育、产卵和孵化的初步试验[J]. 现代渔业信息, 2006, 21(4): 15-17.
- [5] 平洪领,张涛,史会来,等. 横带髯鲷早期生长发育特征[J]. 中国水产科学, 2021, 28(3): 276-287.
- [6] 喻子牛,孔晓瑜,徐文武,等. 斜带髯鲷 *Hapalogenys nitens* (Richardson) 和横带髯鲷 *H. mucronatus* (Eyedoux et Souleyet) 的核型[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(2): 175-180.
- [7] 喻子牛,孔晓瑜,谢宗塘. 山东近海 21 种经济鱼类的核型研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 1-6.
- [8] 卓孝磊,邹记兴. 我国海水鱼类核型及染色体显带研究进展[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(5): 73-80.
- [9] 王世峰,杜桂莹,苏永全,等. 厦门近海横带髯鲷野生群体遗传结构分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(1): 88-93.
- [10] 杨天燕,蒋艳琳,郭易佳,等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因的龙头鱼及其近缘物种分子系统发育研究[J]. 海洋湖沼通报, 2020(6): 77-85.
- [11] 俞正森,宋娜,韩志强,等. 浙江海域天竺鲷科鱼类新纪录种——黑边银口天竺鲷 (*Jaydia truncata*) 形态特征与 DNA 条形码研究[J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(1): 79-85.
- [12] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin version 2000: A software for population genetics data analysis [M]. Geneva: University of Geneva, 2002.
- [13] 徐胜勇,张辉,柳本卓,等. 中日褐鳊群体形态学比较研究[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 960-966.
- [14] 李龙,徐胜勇,张辉,等. 中日褐鳊群体耳石形态学比较分析[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2014, 19(4): 247-252.
- [15] 杨彦平,许萌原,马凤娇,等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因的长江刀鲚群体遗传结构分析[J]. 江西农业学报, 2021, 33(8): 11-16, 23.
- [16] 欧阳美,张晓宇,张富铁,等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因序列的长江中上游草鱼野生和养殖群体遗传多样性比较研究[J]. 淡水渔业, 2021, 51(4): 65-74.
- [17] FERGUSON M. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes [J]. Reviews in fish biology and fisheries, 1994, 4(3): 351-373.
- [18] IRVIN S D, WETTERSTRAND K A, HUTTER C M, et al. Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*. Evidence for founder effects in new world populations [J]. Genetics, 1998, 150(2): 777-790.
- [19] 林浩然. 重要海水养殖鱼类遗传多样性与种质基因组的研究[J]. 科技导报, 2004, 22(9): 4-6.
- [20] 宋娜,都基隆,王志勇,等. 香鱼野生群体和养殖群体遗传多样性比较[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 41-46.
- [21] 赵祥,郑建,高天翔,等. 基于线粒体 DNA 控制区的黄姑鱼养殖群体与野生群体比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(8): 11-19.
- [11] 肖亚梅,陈丽莉,陈合格,等. 中华鳖种群 RAPD 分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2005, 28(3): 72-75.
- [12] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [13] NEI M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106(949): 283-292.
- [14] MCDERMOTT J M, MCDONALD B A. Gene flow in plant pathosystems [J]. Annu Rev Phytopathol, 1993, 31: 353-373.
- [15] LEWONTIN R C. The apportionment of human diversity [M]// DOBZHANSKY T, HECHT M K, STEERE W C. Evolutionary biology: Volume 6. New York: Springer US, 1972: 381-398.
- [16] 庞广昌,姜冬梅. 群体遗传多样性和数据分析[J]. 林业科学, 1995, 31(6): 543-550.
- [17] 王广银,丁文勇,陈少波,等. 浙闽香鱼 4 个群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 科技通报, 2011, 27(6): 863-868.
- [18] 符书源,尹绍武,陈国华,等. 海南近海野生鞍带石斑鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋通报, 2008, 27(3): 25-31.
- [19] 李明云,赵明忠,钟爱华,等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6): 618-624.
- [20] THORPE J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics [J]. Annu Rev Ecol Syst, 1982, 13: 139-168.
- [21] 王利华,张英萍,邹桂伟,等. 基于微卫星标记的中华鳖淮河品系遗传多样性分析[J]. 中国农学通报, 2020, 36(23): 134-141.

(上接第 69 页)