

文章编号: 1004-2490(2011)03-0297-07

基于形态和分子标记的三种鲭科鱼类鉴别新方法

黄昊^{1,2}, 程起群², 郑将臣²

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081;

2. 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 为找到日本鲭(*Scomber japonicus*)、澳洲鲭(*S. australasicus*)和羽鳃鲈(*Rastrelliger kanagurta*)这三种鲭科鱼类鉴别的新标记, 采用形态框架等形态分析方法和线粒体标记的方法开展研究。共分析采自海南的33 ind 样本, 其中日本鲭19 ind, 澳洲鲭9 ind, 羽鳃鲈5 ind。形态判别分析显示, 利用2个可量参数(体高和眼径)或者3个框架参数[D(2-3)、D(3-5)、D(2-4)]构建的判别公式均能鉴别这三种鲭科鱼类, 判别准确率均为100%。通过PCR扩增和测序, 获得三种鲭科鱼类的线粒体细胞色素b(Cytb)和控制区(D-loop)序列。经对位排列, 得到33 ind 样本Cytb和D-loop的一致序列分别为1118 bp和846 bp。Cytb基因共检出17个单倍型, 变异位点195个, 其中10个固定位点是日本鲭所特有, 8个固定位点是澳洲鲭所特有, 147个固定位点为羽鳃鲈所特有; D-loop序列共得到27个单倍型, 变异位点239个, 其中13个固定位点为日本鲭所特有, 10个固定位点为澳洲鲭所特有, 182个固定位点为羽鳃鲈所特有。这些固定位点可以作为三种鲭科鱼类鉴别的分子标记。

关键词: 鲭科; 形态分析; 分子标记; 物种鉴别; 资源管理

中图分类号: **文献标识码:** A

New identification methods for three Scombridae fishes based on morphological and molecular markers

HUANG Hao^{1,2}, CHENG Qi-qun², ZHENG Jiang-chen²

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: *Scomber japonicus*, *S. australasicus*, and *Rastrelliger kanagurta* are three economic fishes in family Scombridae. In order to improve the management and sustainable utilization of these three species, we developed new identification markers from the point of morphology and molecular biology. Thirty-three individuals of these three species, *S. japonicus* 19, *S. australasicus* 9, *R. kanagurta* 5, were collected from Hainan province. Discriminant formula were constructed by using two morphometric (body depth, eye diameter) or three truss system parameters (D(2-3), D(3-5), D(2-4)), and the individuals could be

收稿日期: 2011-04-02

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(2008Z02)和遗传资源与进化国家重点实验室开放课题(GREKF10-01)共同资助

作者简介: 黄昊(1986—), 男, 湖北随州人, 硕士研究生。研究方向: 水产生物种质资源和种群遗传。

通讯作者: 程起群. Tel: 021-65807698; E-mail: qiquncheng@gmail.com

identified with 100% identification accuracy. The cytochrome *b* (cytb) and D-loop sequences of 33 individuals were obtained by using PCR amplification and sequencing, respectively. The consensus sequences of cytb and D-loop were 1 118 bp and 846 bp after alignment. For cytb, 17 haplotypes were defined and 195 variable sites were found. Among the variable sites, 10 sites were unique fixation sites for *S. japonicus*, 8 for *S. australasicus*, and 147 for *R. kanagurta*. For D-loop, 27 haplotypes were detected and 239 variable sites were found. Among them, 13 sites were unique fixation sites for *S. japonicus*, 10 for *S. australasicus*, and 182 for *R. kanagurta*. These fixation sites could be used as the molecular markers for the identification of these three Scombridae fishes.

Key words: Scombridae; morphological marker; molecular marker; species identification; resource management

鲭科(Scombridae)鱼类,在分类学上属鲈形目(Perciformes),鲭亚目(Scombroidei),全球共有15属49种,大多数是重要经济鱼类^[1]。中国主要有三种鲭科鱼类:日本鲭(*Scomber japonicus*)、澳洲鲭(*S. australasicus*)和羽鳃鲈(*Rastrelliger kanagurta*)。其中,日本鲭和澳洲鲭隶属于鲭属,分布于黄海、东海以及南海海域;羽鳃鲈隶属于羽鳃鲈属,分布于东海、南海海域^[2]。

三种鲭科鱼类主要是基于形态可数性状来加以区分。日本鲭与澳洲鲭的形态区别主要在于^[3-4]:日本鲭腹部无斑点,澳洲鲭腹部具斑点。由于存在中间过渡类型,使得这种鉴别标记往往很难区分这两种鲭科鱼类。另外,日本鲭和澳洲鲭的体型、第一背鳍鳍棘和担鳍骨数目也略有不同,但这些指标在日常应用中不甚方便或有效。羽鳃鲈与日本鲭及澳洲鲭的主要差别为^[2]:1)羽鳃鲈犁骨和腭骨无齿;2)羽鳃鲈的鳃耙呈羽状。但羽鳃鲈与日本鲭及澳洲鲭的形态框架等形态分析方法及分子鉴别方法,尚无相关研究报道。

形态框架系统(truss network)^[5]具有能覆盖整个鱼体的优点,线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)属核外DNA,具有分子结构稳定、母系遗传、替换速率相对快、缺少重组等特征,因此形态框架和线粒体标记已被广泛用于近缘种的鉴别^[6-9]。

三种鲭科鱼类,特别是日本鲭与澳洲鲭,在中国渔业经济中占有重要地位,但由于近年来过度捕捞等原因,其资源已呈下滑趋势^[10]。而三种鲭科鱼类的差异尚无形态框架等形态分析方法及分子鉴别方法加以区分,也为三种鱼类资源的管理和可持续开发利用带来不便。因此有必要查明日本鲭、澳洲鲭和羽鳃鲈三者之间的形态框架等形态差异和分子差异,建立准确高效的鉴别标记,为三种鱼类资源的管理和可持续开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本鲭、澳洲鲭和羽鳃鲈的样本均采自海南,样本详细信息见表1。种类鉴定依据成庆泰等^[2]的标准进行。

表1 三种鲭科鱼类的样品信息

Tab.1 The sampling information of three Scombridae fishes

种类 Species	采样时间 Time	采集地 Location	缩写 Abbreviation	样品数目 Number	体重(g) Body Weight	叉长(mm) Range of Fork Length	叉长均值和标准差(mm) Mean and standard deviation of Fork Length
日本鲭 <i>S. japonicus</i>	2009.8	清澜港(文昌)	QLR	19	260.0~520.0	258.64~319.82	279.27±13.90
澳洲鲭 <i>S. australasicus</i>	2009.8	清澜港(文昌)	QLA	9	350.0~400.0	284.72~325.05	305.98±11.93
羽鳃鲈 <i>R. kanagurta</i>	2009.8	白马井(儋州)	BMJ	5	285.0~289.8	247.00~262.76	251.21±6.54

1.2 实验方法

1.2.1 形态分析

1.2.1.1 形态数据收集

每 ind 个体包括 7 个可量数据(体高、头长、吻长、眼径、眼间距、尾柄长和尾柄高)和 15 个框架数据,收集 33 ind 个体共 726 个形态学数据。框架测量坐标点的选取参考 Tzeng 等^[11]。三种鲭科鱼类的测量框架图见图 1。

1.2.1.2 可量参数和框架数据分析

将收集的 7 个可量参数与 15 个框架参数(图 1)分别进行判别分析。为消除叉长对形态分析的影响,用 Reist^[12]公式将各测量参数值进行校正: $e = \exp(\ln Y - b(\ln X - \ln X_L))$,公式中: e 值为校正值, Y 是原始测量值, X 为各样本的叉长, X_L 为各样本叉长的均值, b 为 $\ln Y$ 对 $\ln X$ 的斜率。校正后的数据用 Statistica 8.0 软件进行判别分析。

1.2.2 分子生物学分析

1.2.2.1 DNA 提取

样本取适量背部肌肉后,浸泡于无水乙醇中带回实验室,酚氯仿法^[13]抽提肌肉组织中总基因组 DNA。抽提出的 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,然后稀释到合适的浓度(约 100 ng/ μ L),用于 PCR 扩增。

1.2.2.2 Cytb 和 D-loop 的 PCR 扩增和测序

采用通用引物 L14724 和 H15915^[14]扩增三种鲭科鱼类 33 ind 个体的 mtDNA Cytb 基因。PCR 反应体系包括以下成分:100 ng DNA 模板,0.2 mmol/L dNTPs,引物各 1.0 μ mol/L,4.0 mmol/L $MgCl_2$,5.0 μ L 10 \times reaction buffer,2 U *Taq* 聚合酶,然后加去离子水至终体积 50 μ L。扩增程序如下:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 变性 45 s,55 $^{\circ}C$ 退火 1 min,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。

根据 NCBI 数据库中日本鲭的线粒体基因组全序列,自行设计用于扩增 D-loop 全序列的引物,引物序列如下:FP:5'-TTCCTATTTTGAACCCCTTGTCG-3';RP:5'-GCGTCGTGGCTTCTGTAT-3';PCR 反应体系及扩增程序与 Cytb 基本一致,仅退火温度调整为 52 $^{\circ}C$ 。

PCR 产物用含 EB 的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收纯化后,送上海桑尼生物科技有限公司双向测序。测序引物仍为 PCR 扩增引物。

1.2.2.3 DNA 序列数据分析

测序结果经人工校对拼接后,用 ClustalX 进行比对,获得一致序列。通过 MEGA 4.0^[15]软件统计三种鲭科鱼类的变异位点,找出各种鱼类的固定位点(fixation site)^[16];根据 Kimura 双参数模型(Kimura-2-Parameter, K-2-P)^[17]计算种内与种间遗传距离。

2 结果与分析

2.1 形态学判别分析

对 7 个可量参数和 15 个框架参数分别进行逐步判别分析,结果均显示判别准确率达 100%。

为提高公式的简便性和实用性,从可量参数中挑选贡献度最高的 2 个参数(体高和眼径),从框架参数中选出贡献度最高的 3 个参数[(2-3)、D(3-5)、D(2-4)]分别进行判别分析(参数依据 F 值大小选取,个数依据临界值原则),结果见表 2。

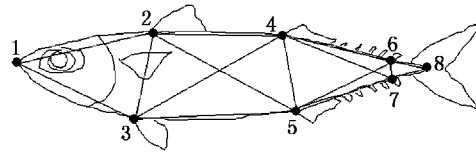


图 1 三种鲭科鱼类的框架测量图
Fig.1 The truss-system parameters of three Scombridae fishes

注:8 个坐标点间的距离组成 15 个框架数据。坐标点:1. 吻前端;2. 第一背鳍起点;3. 腹鳍起点;4. 第二背鳍起点;5. 臀鳍起点;6. 上第五小脂鳍起点;7. 下第五小脂鳍起点;8. 最后一枚尾椎骨。

D(1-2) 表示坐标点 1 和 2 之间的距离,依次类推

Notes: Distances between 8 landmarks consists of 15 truss marks.

The landmarks: 1. origin of kiss; 2. origin of the first dorsal fin;

3. origin of pelvic fin; 4. origin of the second dorsal fin; 5.

origin of the anal fin; 6. origin of the upper fifth inferior finlet; 7.

origin of the lower fifth inferior finlet; 8. the last tailbone.

D(1-2): distance between landmark 1 and 2, and so on

表2 判别分析中贡献最大的参数(按F值大小选择)

Tab.2 Parameters with high contribution to discriminant analysis (ranged by F values)

参数 Parameters	可量参数 Morphometric Parameters		框架参数 Truss System Parameters		
	体高 Body Depth(BD)	眼径 Eye Diameter(ED)	D(2-3)	D(3-5)	D(2-4)
调整后参数 Adjusted Parameters	A(BD)	A(ED)	A(2-3)	A(3-5)	A(2-4)
F-remove 值 F-remove Value	52.064 14	25.986 86	17.963 63	17.190 49	14.058 29
P 值 P Value	0.000 000	0.000 000	0.000 010	0.000 013	0.000 059

分别利用挑选的2个可量参数和3个框架参数构建三种鲭科鱼类的形态判别方程如下:

可量参数判别方程:

$$QLR: Y = 8.191A(BD) + 7.688A(ED) - 304.678;$$

$$QLA: Y = 6.849A(BD) + 8.985A(ED) - 253.543;$$

$$BMJ: Y = 10.001A(BD) + 2.303A(ED) - 329.476。$$

框架参数判别方程:

$$QLR: Y = 7.89A(2-3) + 8.62A(2-4) + 8.87A(3-5) - 1032.33;$$

$$QLA: Y = 6.33A(2-3) + 9.48A(2-4) + 9.04A(3-5) - 1037.67;$$

$$BMJ: Y = 10.412A(2-3) + 5.926A(2-4) + 6.372A(3-5) - 764.534。$$

利用校正后框架参数或可量参数代入上述所对应的判别方程中,分别计算各方程Y值,最大Y值所对应的组即为待检个体所属的种。三种鲭科鱼类的判别准确率见表3。

表3 三种鲭科鱼类的判别结果

Tab.3 Results of discrimination analysis of three Scombridae fishes

组别 Group	可量参数判别组 Morphometric Group				框架参数判别组 Truss System Discriminated Group			
	QLR	QLA	BMJ	准确率(%) Accuracy	QLR	QLA	BMJ	准确率(%) Accuracy
QLR	19	0	0	100	19	0	0	100
QLA	0	9	0	100	0	9	0	100
BMJ	0	0	5	100	0	0	5	100
总计 Total	19	9	5	100	19	9	5	100

2.2 分子生物学分析

2.2.1 固定位点分析

测序获得三种鲭科鱼类的Cytb基因序列长为1118 bp,无插入和缺失位点;D-loop序列长为842~866 bp(其中羽鳃鲈为842 bp,日本鲭为864 bp,澳洲鲭为866 bp)。经比对后,获得三种鲭科鱼类的一致序列(consensus sequence),其中Cytb基因长1118 bp,D-loop为846 bp。Cytb共有17个单倍型,总变异位点195个,其中10个固定位点为日本鲭所特有,8个为澳洲鲭所特有,147个为羽鳃鲈独有(图2);D-loop序列共定义了27个单倍型,总变异位点239个,其中13个固定位点为日本鲭独有,10个为澳洲鲭独有,182个为羽鳃鲈独有(图3)。Cytb和D-loop单倍型序列均已提交至GenBank(登录号分别为Cytb: JF707570~JF707578、HQ843877、HQ843886、HQ843894~HQ843899; D-loop: JF707556~JF707569、HQ843934~HQ843939、HQ843941~HQ843947)。

3 讨论

3.1 三种鲭科鱼类的形态差异

判别分析是多元统计分析中判别样品所属类别的一种重要方法。由于具有很强的实用性,在水产领域有广泛应用^[18-19]。我们用挑选出的2个可量参数(体高和眼径)或者3个框架参数[$D(2-3)$ 、 $D(3-5)$ 、 $D(2-4)$],均能有效的判别三种鲭科鱼类,且判别准确率达100%。这提示三种鲭科鱼类形态学差异主要是与体高和眼径、以及第一第二背鳍间距、腹鳍起点与臀鳍起点间距的差异有关。

理论上,由于三种鲭科鱼类形态差异较小,其判别分析所需的参数应相对较多,且判别准确率一般很难达到100%。但在本研究中,我们基于 F 值挑选的2个可量参数与3个框架参数构建的判别方程均能高效的判别三种鲭科鱼类,这可能与我们的样本量较少有关。

3.2 三种鲭科鱼类的分子鉴别标记

在过去的数十年中,学者往往都是用形态性状和PCR-RFLP技术来鉴别鲭科鱼类,但上述各方法在种类鉴定时都存在一定的缺陷。例如:由于中间过渡类型的存在,使得基于形态斑点有无的方法,很难区分日本鲭和澳洲鲭;Baker等^[20]利用第一背鳍棘数和第一背鳍与第二背鳍间的脉间骨(interneural bone)(澳洲鲭:30~33;日本鲭:26~29)数目区分印度洋及红海的澳洲鲭和日本鲭。但二者脉间骨数目相近,该方法容易出现计数错误。Futoshi^[21]利用PCR-RFLP技术鉴别日本鲭、澳洲鲭以及大西洋鲭(*S. scombrus*)。但该方法首先需自行设计特异性引物,然后通过繁琐的软件寻找合适的限制性内切酶特异性地切割三种鱼类DNA,并且电泳检测显示结果。

Mcdonald等^[16]将种内个体间无碱基差异而种间有明显碱基差异的位点,定义为固定位点(fixation site),并将其作为种间差异的标志,用以区分种内差异和种间差异。利用固定位点鉴别物种简单、快速、准确,其最突出的优点是只需建立一个“碱基矩阵”就能高效的区分相似物种^[22]。本研究基于这一理论,成功的扩增并测定日本鲭、澳洲鲭和羽鳃鲧的Cytb和D-loop序列,并找出其各自的固定位点(图2、图3)。根据这些固定位点,可以简单、准确、高效的鉴别这三种鲭科鱼类。

综上所述,依据形态可量和框架性状建立的判别公式及利用Cytb和D-loop序列的固定位点,均能简便而高效的区分三种鲭科鱼类。这是基于形态和分子标记所建立的三种鲭科鱼类鉴别的新方法,可为这三种鱼类资源的管理和可持续开发利用提供理论基础。

致谢:在样本采集过程中,得到东海水产研究所倪勇、海南省海洋与渔业局潘敏和文昌市渔政监督站吴乾彬等多位同志的大力支持和帮助,特此鸣谢!

参考文献:

- [1] COLLETTE B B, NAUEN C E. FAO Species catalogue Vol 2; Scombrids of the world [M]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1983.
- [2] 成庆泰, 郑宝珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 417-418.
- [3] 沈世杰. 台湾鱼类检索[M]. 台北: 台北南天书局, 1984: 426.
- [4] 庄平, 王幼槐, 李圣法, 等. 长江口鱼类[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 361-363.
- [5] STRAUSS R E, BOOKSTEIN F L. The truss; body form reconstructions in morphometrics [J]. Systematic Zoology, 1982, 31(2): 113-135.
- [6] CHENG Q Q, LU D R, MA L. Morphological differences between close populations discernible by multivariate analysis: A case study of genus *Coilia* (Teleostei: Clupeiforms) [J]. Aquatic Living Resources, 2005, 18(2): 187-192.
- [7] ZHANG X G, ZHANG H, XIONG B X. Subspecies validity for genus *Culter* (Teleostei: Cyprinidae) based on morphometrics analysis [J]. Environmental Biology of Fishes, 2009, 86(1): 193-201.
- [8] FUMAGALLI L, CABRITA C J, CASTELLA V. Simultaneous identification of multiple mammalian species from mixed forensic samples based on mtDNA control region length polymorphism [J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2009, 2(1): 302-303.
- [9] PASCOAL A, BARROS V, ORTEA J, et al. Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16SrRNA mtDNA [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(4):1457-1461.
- [10] 王 凯, 严利平, 程家骅, 等. 东海鲈鱼资源合理利用的研究[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(4):337-343.
- [11] TZENG T D. Morphological variation between populations of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) off Taiwan[J]. *Fisheries Research*, 2004, 68(1-3):45-55.
- [12] REIST J D. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1985, 63(6):1429-1439.
- [13] SAMBROOK J, RUSSELL D. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. CSHL Press, 2001.
- [14] XIAO W H, ZHANG Y P, LIU H. Molecular Systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, Biogeography and Coevolution of a Special Group Restricted in East Asia [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18(2):163-173.
- [15] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [16] MCDONALD J H, KREITMAN M. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1991, 351(6328):652-654.
- [17] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2):111-120.
- [18] 李晨虹, 李思发. 中国沿海六水系绒毛蟹(中华绒毛蟹和日本绒毛蟹)群体亲缘关系:形态判别分析[J]. *水产学报*, 1999, 23(4):337-342.
- [19] 黎中宝, 李少菁, 王桂忠. 中国东南沿海锯缘青蟹群体的形态判别分析[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(1):102-110.
- [20] BAKER E A, COLLETT B B. Mackerel from the northern Indian Ocean and the Red Sea are *Scomber australasicus* not *Scomber japonicus* [J]. *Ichthyological Research*, 1998, 45(1):29-33.
- [21] FUTOSHI A. PCR-RFLP Analysis of nuclear nontranscribed space for mackerel species identification [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(3):508-511.
- [22] BOTTERO M T, DALMASSO A. Animal species identification in food products: Evolution of Biomolecular Methods [J]. *The Veterinary Journal*, 2010(1997):2000-2004.