

胡玉婷,段国庆,凌俊,等. 金色鳊鱼选育群体与野生群体的遗传变异分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):197-200.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.050

金色鳊鱼选育群体与野生群体的遗传变异分析

胡玉婷,段国庆,凌俊,江河,侯冠军

(安徽省农业科学院水产研究所,安徽合肥 230031)

摘要:采用线粒体 *Cyt b* 基因为分子标记,研究金色鳊鱼选育群体与安徽三大水系野生鳊鱼群体的遗传多样性及亲缘关系。结果显示,110 个样品的 *Cyt b* 基因全序列长为 1 141 bp,野生群体共检出 12 个核苷酸变异位点(变异率 0.011%)、12 种单倍型,选育群体无变异位点,仅包含 1 个单倍型,群体遗传多样性低。序列碱基 A、T、G、C 的平均含量分别为 26.1%、28.4%、14.5%、30.9%,A+T 含量(54.5%)>G+C 含量(45.5%)。分子变异分析(AMOVA)中,21.64% 遗传变异来自群体间,说明鳊鱼群体间产生了一定程度的遗传分化。群体间分子系统树显示,金色鳊鱼选育群体与淮河群体鳊鱼亲缘关系更接近,而长江群体处于淮河群体与新安江群体的过渡,这与各野生群体所处地理位置相关。

关键词:鳊;选育群体;细胞色素 b;遗传变异

中图分类号: S961.2;S965.127 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0197-03

鳊(*Siniperca chuatsi*),又名翘嘴鳊,是驰名中外的名贵淡水经济鱼类,为东亚特有种,具有十分重要的生态和经济价值,主要分布于中国、朝鲜半岛、日本等地^[1-2]。长期的人工养殖使鳊种质退化严重。鉴于养殖鳊抗病力低、耐饥饿程度低、优良种苗供应率低等制约因素^[3-6],2008 年始研究者利用安徽省内鳊鱼资源开展鳊抗耐性目标选育,意外发现并选择了体色变异个体(金黄色)进行群体选育,已获得体色(金黄色)较为稳定的遗传基础群体。经研究发现,现有遗传基础群体不仅体色变异——金黄色,还表现出综合抗耐性强、相互残杀低、繁殖性状好等特征。

目前,关于金色鳊鱼选育群体的遗传背景尚不清楚,细胞色素 b(Cytochrome b, *Cyt b*)是动物线粒体 DNA(mtDNA)中结构和功能了解最为清楚的蛋白质基因,具有引物通用性高、长度适宜、进化速率适中等特点,广泛应用于群体遗传学及分子系统学等研究^[7-9]。研究通过金色鳊鱼选育群体与安徽三大水系(长江、淮河及新安江)野生鳊群体比较分析,探讨金色鳊鱼的遗传结构及与野生鳊的亲缘关系,可为金色鳊鱼下一步的选育提供参考依据。

1 材料与与方法

1.1 样品采集

金色鳊鱼样品采自安徽省滁州市长江水产良种场选育的金色鳊鱼群体(30 尾);野生鳊样品分别采集于安徽长江流域(芜湖市淞港段,26 尾)、淮河流域(凤台县峡山口,29 尾)、新

安江流域(歙县深渡段,25 尾)。解剖取样品鱼背部肌肉在 95% 乙醇中保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增、测序

鳊基因组 DNA 采用生工生物工程(上海)有限公司提供的动物基因组提取试剂盒提取。引物序列为 L14724 和 H15915^[10]。PCR 扩增体系为:10 × buffer (MgCl₂) 5.0 μL, dNTP(10 mmol/L)4.0 μL,引物(10 mmol/L)各 1.5 μL,模板 DNA(50 ng/L)2 μL, *Taq* DNA Polymerase(5 U/μL)0.3 μL,加超纯水至 50 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,51 °C 退火 35 s,72 °C 延伸 45 s,35 个循环;72 °C 延伸 8 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的长度和浓度合格后,委托生工生物工程(上海)有限公司纯化与双向测序,测序引物同上。

1.3 数据分析

使用软件 Clustal X^[11] 和 Seaview^[12] 校正、比对序列;DNAsp 5.0^[13] 计算多态位点、单倍型数量、单倍型多样性及核苷酸多样性;Mega 4.0^[14] 计算序列碱基组成、变异率、群体间遗传距离(Kumara 2-parameter 距离模型)及构建分子系统树(NJ-tree);软件 Network 5.001 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) 绘制单倍型进化网络图;Arlequin 3.5^[15] 计算群体遗传分化系数(F-statistics, FST)和分子变异分析(analysis of molecular variance, AMOVA)。

2 结果与分析

2.1 序列特征

经比对后,所有鳊样品的线粒体 *Cyt b* 同源序列长 1 141 bp,均无碱基插入和缺失,变异位点 12 个(变异率 0.011%),包括简约信息位点 7 个,单突变位点 5 个。其中,选育群体无变异位点。碱基平均含量:A(26.1%)、T(28.4%)、G(14.5%)和 C(30.9%),A+T 含量(54.5%)显著高于 G+C 含量(45.5%),表现为明显的碱基组成偏倚性。序列变异主要发生在三联密码子的最后一位,符合蛋白质编码基因密码子第 3 位点进化最快的一般规律。

收稿日期:2017-05-03

基金项目:安徽省财政专项资金(编号:16B0515);安徽省农业科学院人才发展专项资金(编号:16F0505);安徽省水产产业技术体系专项(编号:皖农科[2016]84 号);安徽省农业科学院成果推广项目(编号:16E0506)。

作者简介:胡玉婷(1986—),女,河南永城人,博士,助理研究员,主要从事鱼类生态学研究。E-mail:huyuting1021@126.com。

通信作者:侯冠军,研究员,主要从事鱼类品种资源及养殖技术研究。E-mail:hgj2005hf@163.com。

2.2 单倍型

4个群体110条 *Cyt b* 序列包含12种单倍型(表1),各群体包含单倍型类型及个数差异较大。其中,金色鳊鱼选育群体仅包含分布最广泛的1个单倍型(Hap1),显示出极低的遗传多样性。野生群体独有单倍型较多(8个,占比66.7%),

其中仅包含1个样品的单倍型6个。群体间共有单倍型较少,仅有4个,但包含样品数较多(90.0%)。所有群体均含有的单倍型(Hap1)包含71个样品(出现率64.5%);另有3种单倍型(Hap5、Hap7、Hap8)分别为2个群体共有,包含样品数分别为10、6、12个。

表1 鳊单倍型的分子系统树及其群体分布

单倍型分子系统树	单倍型	数目	群体			
			J	H	C	X
	Hap1	71	30	15	16	10
	Hap2	1		1		
	Hap3	1		1		
	Hap4	1		1		
	Hap5	10		8		2
	Hap6	3		3		
	Hap7	6			4	2
	Hap8	12			1	11
	Hap9	2			2	
	Hap10	1			1	
	Hap11	1			1	
	Hap12	1			1	

注:J、H、C和X分别代表金色鳊鱼、淮河、长江和新安江鳊鱼群体,下同。

由表1、图1可知,各群体单倍型的分布表现出一定的地理结构,它们以Hap1为中心向外辐射,其余单倍型均可由Hap1经1~4个碱基置换而得。野生群体中,长江群体介于淮河和新安江之间,表现为两者的过渡。

表2 鳊群体的遗传多样性参数

群体	样本数 (个)	单倍型数 (种)	多态位点数 (个)	单倍型多样性 (H_d)	核苷酸多样性 (P_i)
J	30	1	0	0.000 0	0.000 00
H	29	6	7	0.665 0	0.001 26
C	26	7	6	0.609 2	0.001 24
X	25	4	3	0.660 0	0.001 03
总体	110	12	12	0.563 8	0.001 03

0.001 48),尤其新安江群体与所有群体间的遗传距离均较大(0.001 31~0.001 48),其中淮河群体与新安江群体间遗传距离最大。群体间遗传分化系数 F_{ST} 值(0.091 74~0.537 43)均明显大于0.05,且有极显著差异($P < 0.001$)。

表3 鳊群体间遗传距离(对角线上)和遗传分化系数 F_{ST} 值(对角线下)

群体	遗传距离(对角线上)/遗传分化系数(对角线下)			
	J	H	C	X
J		0.000 76	0.000 74	0.001 05
H	0.171 88		0.001 38	0.001 48
C	0.182 06	0.091 74		0.001 31
X	0.537 43	0.226 91	0.134 38	

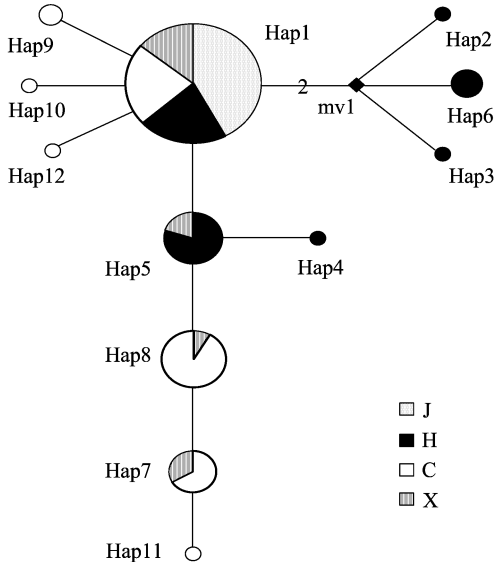
注:所有 F_{ST} 值 $P < 0.001$ 。

分子变异分析(AMOVA)结果显示,来自群体间遗传变异为21.64%,群体内变异为78.36% ($P < 0.001$);表明4个群体间产生了一定程度的遗传分化。

表4 鳊群体间分子变异分析(AMOVA)

变异来源	自由度 (df)	方差组分	变异比例 (%)	P 值
群体间	3	0.134 88	21.64	0.000 0
群体内	106	0.488 34	78.36	0.000 0
总变异	109	0.623 23	100.00	0.000 0

基于群体间遗传距离矩阵构建的群体间分子系统树(NJ-tree)见图2。由图2可知,与单倍型系统树、单倍型进



圆大小表示单倍型分布频率;单倍型间数字表示碱基置换数,无数字则置换数为1

图1 基于线粒体 *Cyt b* 序列的鳊单倍型简约进化网络

2.3 遗传多样性

由表2可知,鳊鱼各群体单倍型多样性普遍较高(0.609 2~0.665 0),核苷酸多样性偏低(0.000 00~0.001 26)。其中,金色鳊鱼选育群体单倍型多样性和核苷酸多样性均最低;淮河群体单倍型多样性和核苷酸多样性均最高。三野生群体的遗传多样性大致在同一水平,鳊鱼长江群体单倍型多样性略低、新安江群体核苷酸多样性略低。

2.4 遗传结构

由表3可知,群体间平均遗传距离较大(0.000 74~

化网络图结果类似,选育群体与淮河群体亲缘关系更近,长江群体介于淮河群体与新安江群体之间。

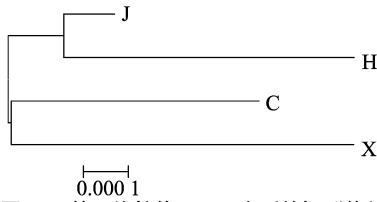


图2 基于线粒体 *Cyt b* 序列的鳊群体间系统树

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性是物种适应环境变化所必需的,是生物进化的物质基础。种内遗传多样性是一个物种对外界干扰能否成功反应的决定性因素。种群内的遗传多样性反映了物种的进化潜力,物种的遗传变异越丰富,对环境的适应性越广^[16]。由于亲本基数较少、近亲繁殖和遗传漂变等因素影响,人工养殖的水产动物的群体遗传多样性一般低于野生群体^[17-19];而育种群体的遗传多样性随选育进程逐渐下降,后代群体表现为更低的遗传多样性水平^[20-23]。研究结果显示,野生鳊鱼群体的遗传多样性大致在同一水平,单倍型多样性(*Hd*)较高、核苷酸多样性(*Pi*)较低;选育群体的单倍型多样性(*Hd*)和核苷酸多样性(*Pi*)均远低于野生群体,尤其是选育群体30个样品中未见任何线粒体 *Cyt b* 遗传变异,*Hd* 和 *Pi* 极低。这是由于金色鳊鱼的第一代个体数量特别少,而历代选择繁育的亲本(体色较黄)基数也小,选择压力低,使其后代保持了非常低的遗传多样性水平。

尽管如此,研究中发现金色鳊鱼表现出许多较好的经济性状(综合抗耐性强、相互残杀低、繁殖性状好等特征),这说明其尚未出现种质衰退的状况。这是因为线粒体 *Cyt b* 基因的变异与上述这些经济性状相关基因无相关关系。考虑到试验选取的样品数有限,且使用了单一的仅母系遗传的分子标记,金色鳊鱼选育群体及其后代的遗传多样性状况还需要更加全面和深入的研究。

3.2 鳊群体的遗传结构

安徽地跨长江、淮河、新安江三大水系,是我国鳊鱼资源生态优势区,既是鳊鱼资源的天然基因库,又是鳊鱼的传统养殖区。金色鳊鱼选育群体在各地地方群体相互交配的育种过程中被发现。群体间系统进化树结果显示,金色鳊鱼选育群体与淮河群体鳊鱼亲缘关系更接近;但选育群体的唯一单倍型(*Hap1*)在三大水系野生群体中均为优势单倍型;说明单倍型1分布十分广泛,由于选育群体的亲本个体较少,难以就此确定其母系来自哪个群体。

遗传分化系数(F_{ST})用于衡量群体间遗传分化程度,其值大小代表群体分化程度的高低, F_{ST} 为0.00~<0.05、0.05~<0.15、0.15~<0.25时分别被认为无分化、中度分化和高度分化^[24]。研究中群体间 F_{ST} 值(0.09174~0.53743)均大于0.05($P<0.001$),表明各群体间存在一定程度的遗传分化。野生群体间,基于单倍型分子系统树和简约进化网络图的结果均显示,长江群体处于淮河群体与新安江群体的过渡,这与各野生群体所处地理位置相关。这种遗传距离随地理距离而变化的

特征在许多鱼类亲缘地理学研究中普遍存在^[25-26]。

参考文献:

- [1]周才武,杨青,蔡德霖. 鳊亚科鱼类的分类整理和地理分布[J]. 动物学研究,1989,9(2):113-126.
- [2]李思忠. 鳊亚科鱼类地理分布的研究[J]. 动物学杂志,1991(4):40-44.
- [3]方展强,陈军,郑文彪,等. 鳊野生群体与养殖群体的RAPD分析[J]. 大连水产学院学报,2005,20(1):16-19.
- [4]杨承泰,王卫民,曹玲. 鳊鱼养殖中的常见疾病及其防治[J]. 水利渔业,2008,28(3):104-107.
- [5]安伟,肖雨,张崇文,等. 鳊鱼传染性脾肾坏死病毒 *Taq Man* 荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2014(3):214-217.
- [6]Fu X, Lin Q, Liu L, et al. Display of ISKNV orf086 protein on the surface of *Aeromonas hydrophila* and its immunogenicity in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 56:286-293.
- [7]Hewitt G M. Genetic Consequences of climatic oscillations in the Quaternary [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2004, 359(1442):183-195; discussion 195.
- [8]Tang Q, Liu H, Mayden R, et al. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 39(2):347-357.
- [9]杨天燕,孟玮,海萨,等. 基于线粒体 *Cyt b* 序列对新疆额尔齐斯河贝加尔雅罗鱼遗传结构的分析[J]. 动物学杂志,2017,52(2):304-313.
- [10]Xiao W, Zhang Y, 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.
- [11]Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.
- [12]Galtier N, Gouy M, Gautier C. Seaview and Phylo_win; two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny [J]. Computer Applications in the Biosciences, 1996, 12(6):543-548.
- [13]Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11):1451-1452.
- [14]Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8):1596-1599.
- [15]Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3):564-567.
- [16]蒋志刚,马克平. 保护生物学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2014:343-386.
- [17]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.
- [18]韩承慧,马海涛,姜海滨,等. 许氏平鲈 (*Sebastes schlegeli*) 微卫星标记开发及野生、养殖群体遗传多样性分析[J]. 海洋与湖

陈琳,管远红,黄东璋,等. 中药与庆大霉素联合对16S rRNA甲基化酶耐药重组菌的作用研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):200-203. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.051

中药与庆大霉素联合对16S rRNA甲基化酶耐药重组菌的作用研究

陈琳,管远红,黄东璋,齐富刚,张洪涛,陈冬冬,区卓麟,于森森,
吴怀秀,杨雨秋,陈瀛川,王亚南,苏哲君,张欢
(江苏农牧科技职业学院动物医学院,江苏泰州 225300)

摘要:为分析中药与庆大霉素联合对16S rRNA甲基化酶RmB耐药重组菌的作用,采用棋盘稀释法测定庆大霉素与黄连、五倍子、连翘、黄芩、乌梅的联合抑菌指数(frictional inhibitory concentration index, FICI)。试验结果表明,黄连、五倍子、连翘、黄芩、乌梅与庆大霉素的联合抑菌指数(FICI)分别为0.75、0.25、1.50、2.00、0.75。提示中药五倍子与庆大霉素联合有协同作用,黄连、乌梅与庆大霉素联合有相加作用,连翘、黄芩与庆大霉素联合呈现无关作用。

关键词:16S rRNA甲基化酶;庆大霉素;中药;抗耐药;棋盘稀释法;联合药敏试验

中图分类号:S859.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)20-0200-04

当前,耐药性是临床抗感染治疗面临的严重挑战,抗耐药菌感染已成为全球性临床医学重大难题^[1-5]。研究表明,中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐药鲍曼不动杆菌、产超广谱 β -内酰胺酶耐药菌均有一定的影响和作用^[6-10]。虽然从抗菌效价或抗菌作用强度比较,几乎所有中药的抗菌作用均弱于抗生素^[11],但是由于中药不但可以作用于细菌繁殖的不同阶段及多个代谢环节,中药和西药联用还可以相得益彰,为临床用药提供更多的选择^[12],同时,中药能够从整体上提高机体的免疫功能,减轻感染引起的病理损害,起到非特异性治疗的作用^[5]。如熊南燕等报道,体内外无抗菌活性的鱼腥草注射液,对兔体内硫酸庆大霉素注射液抗菌活性有明显增强作用^[13]。

笔者所在课题组前期研究中发现,中药黄连、黄芩、五倍

子、连翘等对16S rRNA甲基化酶RmtB耐药重组菌有一定的抑制作用,而氨基糖苷类抗生素是治疗革兰氏阴性菌感染的重要药物,由于16S rRNA甲基化酶的出现,导致庆大霉素、阿米卡星等氨基糖苷类抗生素在临床抗革兰氏阴性感染中丧失其作用。因此,本研究拟以构建的16S rRNA甲基化酶RmtB耐药重组菌为研究对象,研究黄连、五倍子、黄芩等几种中药免煎颗粒联合庆大霉素对16S rRNA甲基化酶RmtB耐药重组菌的作用,一方面为临床用药提供依据,另一方面,为16S rRNA甲基化酶耐药菌感染提供更多的治疗用药选择。

1 材料与与方法

1.1 菌株

16S rRNA甲基化酶RmtB耐药重组菌 pRmtB1。质控菌 *E. coli* ATCC 25922,购自卫生部药品生物制品检定所。

1.2 培养基

水解酪蛋白肉汤(MH Broth),水解酪蛋白琼脂(MH agar),购自杭州天和微生物试剂有限公司。红四氮唑,购自扬州科能生物技术有限公司。

1.3 供试药物

黄连颗粒(批号1501140,生药含量3g)、醋五味子颗粒(批号1502099,生药含量6g)、连翘颗粒(批号1411052,生药

收稿日期:2017-05-02

基金项目:中国博士后科学基金面上项目(编号:2013M541740);江苏省泰州市科技支撑项目(编号:TN201519);江苏农牧科技职业学院重点项目(编号:NSF201503、NSF201603);江苏农牧科技职业学院大学生创新创业训练计划(编号:201612806037Y)。

作者简介:陈琳(1970—),女,四川大竹人,博士,副教授,主要从事抗菌药物耐药机制及兽药安全性评价工作。E-mail: chenlin2008666@126.com。

沼,2016,47(1):213-220。

[19] 谌微,张凤英,王景,等. 基于COI基因序列的东、黄海区野生与养殖大黄鱼遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2016,23(6):1255-1267。

[20] 陈雪峰,杨国梁,孔杰,等. 人工养殖与选育对罗氏沼虾遗传多样性的影响[J]. 水生生物学报,2012,36(5):866-873。

[21] 郑荷子,易提林,梁旭方,等. 翘嘴鲌连续4代选育群体遗传多样性及遗传结构分析[J]. 淡水渔业,2013,43(6):8-12。

[22] Loughnan S R, Domingos J A, Smith-Keune C, et al. Brood stock contribution after mass spawning and size grading in barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch)[J]. Aquaculture,2013,404:139-149。

[23] Vela-Avitua S, Montaldo H H, Marquez-Valdelamar L, et al. Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information[J]. Electronic Journal of Biotechnology,2013,16(4):11。

[24] Wright S. Evolution and the genetics of populations[M]. Chicago: University of Chicago Press,1978:580。

[25] 马波,姜作发,霍堂斌. 下游黑龙江茴鱼种群遗传变异及地理分化的微卫星分析[J]. 中国水产科学,2009,16(5):678-688。

[26] 傅建军,李家乐,沈玉帮,等. 草鱼野生群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传,2013,35(2):192-201。