

谢佳燕, 颜 渊, 杨钰慧. 达氏鲌不同地理种群线粒体 *CO I* 基因遗传多态性的研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(3): 37–40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.008

达氏鲌不同地理种群线粒体 *CO I* 基因遗传多态性的研究

谢佳燕, 颜 渊, 杨钰慧

(武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要:采用线粒体 *CO I* 基因序列对我国长江中下游达氏鲌天然种群的遗传变异进行研究。结果表明, 达氏鲌不同自然种群的遗传变异程度较低, 基因多态性为 0.412 3, 核苷酸多态性为 0.001 1。各群体间特有单倍型较少, 多数个体分布于共享单倍型中。分子变异分析 (AMOVA) 表明, 达氏鲌野生群体间具有明显的遗传分化, 群体间的变异为 33.09%, 丹江口种群解释了群体间该遗传变异组成的 71.47%, 其余的达氏鲌群体间无明显分化, 种群间存在一定的基因流动。达氏鲌自然种群的遗传组成可能与不同群体所处的地理位置有关, 水系间的相互连通, 不同地理种群间存在基因交流, 可能减弱了由地理距离产生的种群间的遗传差异。

关键词:达氏鲌 (*Chanodichthys dabryi*); *CO I* 基因; 自然种群; 遗传差异

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)03-0037-03

达氏鲌 (*Chanodichthys dabryi*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae), 在我国广泛分布于江河、湖泊、水库等水系, 是我国内陆天然水体中重要的经济鱼类^[1]。达氏鲌是长江中下游湖泊鱼类群落的优势物种之一, 其个体较大、肉质细嫩、味道鲜美, 富含多种氨基酸, 具有较高的营养价值^[2]。此外, 达氏鲌等鲌属鱼类还具有重要的生态价值, 可通过捕食水体中的小型鱼类, 控制它们的种群密度, 从而保持水体生态系统稳定^[1], 因而对于提高水产经济效益具有不可忽视的作用。然而, 由于过度捕捞和环境污染, 自然水体中鲌属鱼类资源急剧衰退。为弥补天然资源的不足和满足市场需求, 已对该属鱼种的人工繁育进行了相应的研究^[3]。但人工养殖时近亲繁殖概率增高及生态环境单一等因素, 可导致物种遗传多样性降低甚至种质退化^[4-5]。另外, 由于养殖品种的逃逸, 还可通过杂交、竞争和污染影响自然水域中的野生种群^[6], 最终对该鱼种整体遗传多样性水平产生影响。水产原种、良种是重要的水产种质资源, 是水产养殖业结构调整和水产业持续健康发展的首要物质基础。因此, 对物种天然种群进行种质资源鉴定和遗传多样性评估, 对促进鱼种的研发和可持续利用具有重要的实践意义。

长江是我国重要的天然淡水鱼类种质资源基因库^[7], 达氏鲌是长江流域中重要的经济鱼类和优质鱼种, 其生物学特性、种群遗传多样性等方面已有相应的研究^[8-9], 但基于 *CO I* 基因序列进行不同达氏鲌自然种群间遗传组成和鉴定方面的研究较少^[8]。因此, 本研究对我国长江中下游流域不

同达氏鲌种群进行 *CO I* 基因序列 5' 端测序, 检测不同水域达氏鲌种群间的遗传组成和遗传关系, 以期为我国经济鱼类种质资源的保护和可持续利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

试验中达氏鲌样本于 2011 年 5—12 月分别采自于长江中下游流域的湖北省当阳市 (DY)、湖北省东湖 (DH)、湖北省丹江口市 (DJ)、江西省宜春市 (JX) 和安徽省黄山市 (AH)。标本取肌肉样于 95% 乙醇中固定, -20 ℃ 保存。

1.2 样本 DNA 的提取、PCR 扩增反应及测序

采用标准的酚/三氯甲烷法提取达氏鲌基因组 DNA^[10], 利用引物 FishF1/FishR2 扩增 *CO I* 基因序列^[11]。PCR 扩增反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 50 s, 52 ℃ 1.0 min, 72 ℃ 1.5 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10.0 min。采用 Qiagen 的 QIAquick PCR 产物纯化试剂盒进行回收纯化, 在 ABI 377 DNA 测序仪上利用扩增引物进行双向测序。

1.3 数据分析

采用 ClustalX1.83^[12] 和 Seaview^[13] 软件进行 *CO I* 基因片段核苷酸组成和序列分析。从 GenBank 下载翘嘴鲌 (*Chanodichthys alburnus*, 序列号 AP012109、GU190362、KF039719、KM044500、KX244761、KX244762、KX829025 - KX829028), 蒙古鲌 (*C. mongolicus*, 序列号 KF826087、NC_008683、KC701385、AP009060), 海南鲌 (*C. recurviceps*, 序列号 KJ609181、NC_024277), 拟尖头鲌 (*C. oxycephaloides*, 序列号 KY404014), 以及鲤属鲤 (*Cyprinus carpio*, 序列号 KJ511883) 和东方高原鳅 (*Triplophysa orientalis*, 序列号 KJ631323) 的线粒体 DNA 全序列, 与其他鲌属鱼类的 DNA 序列进行比对, 识别 *CO I* 序列并进行不同鱼种的比较分析。以 Kimura 双参数法 (Kimura-2-parameter) 为替代模型, 采用 MEGA 6.0 软件^[14] 中的 NJ 法 (neighbour-joining) 构建不同物种间的聚类

收稿日期: 2017-10-11

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划 (编号: B2017076); 武汉轻工大学科研项目 (编号: 2016y31); 武汉轻工大学生物与制药工程学院科研项目 (编号: 2016s3)。

通信作者: 谢佳燕 (1974—), 女, 云南文山山人, 博士, 副教授, 主要从事分子生态学的研究。E-mail: xjyaphid@163.com。

树,分支的置信度采用自引导法(bootstrap analysis)重复检测 1 000 次。用 Arlequin 3.5^[15] 进行遗传多样性、群体的分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)、遗传分化指数(F_{st})和基因流(N_m)值的计算。

2 结果与分析

2.1 达氏鲌 *CO I* 基因片段核苷酸组成特点及单倍型组成

对不同种群达氏鲌的线粒体 *CO I* 序列进行排列和比对,获得 *CO I* 基因 5'端长度为 648 bp 的同源序列,无插入或碱基缺失。该序列中相对碱基频率分别为 A=0.259 3, T=0.284 2, G=0.182 3, C=0.274 1, 碱基 G 的含量最低,表现出明显的碱基偏倚性,但碱基组成在达氏鲌不同种群间无明显差异。在达氏鲌 *CO I* 基因序列的所有位点中,共发现 4 个碱基变异位点,其中,3 个位点发生了碱基转换,1 个位点发生颠换,但翻译后所有氨基酸组成均相同,表明 *CO I* 基因编码在达氏鲌鱼类中的保守性。这些变异共组成了 5 种单倍型,各单倍型在达氏鲌种群间的分布见表 1。除单倍型 1 和 3 在超过 2 个种群间共享外,其余单倍型均为单个种群所特有。

表 1 达氏鲌不同种群 *CO I* 基因序列的单倍型分布

| 采样点 | 种群 | 单倍型分布 | | | | |
|---------|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Hap 1 | Hap 2 | Hap 3 | Hap 4 | Hap 5 |
| 湖北省当阳市 | DY | 3 | | 10 | | |
| 湖北省东湖 | DH | 2 | 1 | 7 | | 1 |
| 湖北省丹江口市 | DJ | 3 | | | | |
| 江西省宜春市 | JX | | | 10 | | |
| 安徽省黄山市 | AH | | | 9 | 1 | |

2.2 不同达氏鲌种群的遗传多态性

对达氏鲌不同地理种群的遗传多态性进行检测,由表 2 可知,所有达氏鲌个体的基因多态性(H)为 0.412 3,核苷酸多态性(π)为 0.001 1。不同种群间遗传多态性存在一定差异,种群间的基因多态性和核苷酸多态性最高为东湖种群(DH),而丹江口(DJ)和宜春(JX)种群仅有一种单倍型,遗传多样性指数值均为 0。

表 2 达氏鲌种群的基因多态性和核苷酸多态性

| 种群 | 样本量 (n) | 基因多态性 (H) | 核苷酸多态性 (π) |
|----|----------------|------------------|---------------------|
| DY | 13 | 0.384 6 | 0.001 2 |
| DH | 11 | 0.600 0 | 0.001 5 |
| DJ | 3 | 0 | 0 |
| JX | 10 | 0 | 0 |
| AH | 10 | 0.200 0 | 0.000 3 |

2.3 达氏鲌种群的遗传结构与分化

对达氏鲌两两种群之间的 F_{st} 值和基因流 N_m 值进行检测,由表 3 可知,成对 F_{st} 值大小变化在 -0.074 5~1.000 0 之间,其基因流大小变化于 0~4.282 4 之间。统计分析表明,除 DJ 群体与其他群体间的 F_{st} 值存在显著差异外($P<0.05$),其余的群体间无明显差异,种群间存在一定的基因流动。

对达氏鲌不同种群进行了分子变异分析,结果表明,遗传变异主要发生在种群内为 66.91%,而不同种群间为 33.09%,不同种群间存在明显的分化。根据 F_{st} 的结果,将所

表 3 达氏鲌不同种群间的成对 F_{st} (下斜角)和 N_m 值(上斜角)

| 种群 | DY | DH | DJ | JX | AH |
|----|----------|----------|----------|----------|---------|
| DY | | | 0.314 5 | 3.656 3 | 3.749 7 |
| DH | -0.074 5 | | 0.379 0 | 4.192 2 | 4.282 4 |
| DJ | 0.613 9* | 0.568 9* | | 0.000 0 | 0.041 4 |
| JX | 0.120 3 | 0.106 6 | 1.000 0* | | |
| AH | 0.117 7 | 0.104 6 | 0.923 5* | -0.011 2 | |

有种群分为两组(DJ 种群及其余的所有种群)进行 AMOVA 分析。结果表明,DJ 种群解释了 2 组类群间遗传变异组成的 71.47%。

基于 Kimura 双参数法,从 NCBI 下载鲌属其他 4 种鱼类的 *CO I* 序列进行比对,计算鲌属不同鱼类的种内和种间遗传距离。结果表明,鲌属不同鱼类种内平均遗传距离为 0.002 8,种间遗传距离平均值为 0.038 8,种间遗传距离>10 倍的种内遗传距离。以鲤属鲤(*Cyprinus carpio*, 序列号 KJ511883)和东方高原鳅(*Triplophysa orientalis*, 序列号 KJ631323)的线粒体 *CO I* 序列作为外群,构建 NJ 聚类树(图 1)。结果表明,鲌属鱼类聚成独立的一支,之后又形成分属于鲌属不同鱼种的分支,分支间的节点支持率较高。其中,达氏鲌的所有单倍型聚成独立的一支,但并未形成以地理类群进行聚类的分支。

3 讨论

鲌属鱼类是东亚特有鲤科鱼类中较为重要的类群^[1],其经历了相同的短时间物种暴发,作为一群快速分化的物种,其基因序列的变异度相对较小^[16]。因此,对该经济鱼类的有效鉴定,对长江流域天然淡水鱼类种质资源基因库的保护具有重要的实践意义。许多研究已表明,*CO I* 基因片段可作为动物条形码识别外形相似种和检测种群遗传多样性^[17-19]。本研究分析发现,鲌属鱼类 *CO I* 基因片段的种间遗传距离与种内距离相差 10 倍以上,NJ 聚类树也表明鲌属鱼类聚成独立的一支,聚类分支间鲌属不同物种的分类与形态学分类结果基本一致,从而揭示 *CO I* 基因序列适于物种鉴定的内在特征^[17,20],这与利用 *CO I* 基因中更长的序列片段对鲌属鱼类进行有效区分的结论一致^[8]。

遗传多样性是种群极为重要的特征之一,它是物种适应未来环境的变化所必需^[21]。对不同达氏鲌地理种群的研究表明,其野外种群的遗传变异程度较低,各群体间特有单倍型较少,多数个体分布于共享单倍型中。这与采用 *CO II* 基因序列分析鲌属翘嘴鲌野生群体的结果类似^[22]。这可能与近年来长江流域环境污染日益严重,梯级水利设施的大规模构建和过度捕捞等因素有关,从而导致自然水体中的鱼类资源急剧衰退,天然种群的遗传多样性水平降低。由于人工繁殖所用亲本首要来源于部分的野生群体,而经过人工繁育后,群体的遗传多样性会出现一定程度的下降^[4]。因此,在实际育种工作中,为确保育种对象的遗传多样性维持在一定水平,以顺利实现育种目标,应适当增加育种群体的亲本数量,引进更多的地理群体。

根据化石记录地质年代和地理分布,鲤科鱼类可划分为 5 个类群,鲌亚科鱼类分属东亚类群^[1]。一些研究认为,东亚类群是青藏高原急剧隆升后,在东亚季风气候条件下鲤科鱼

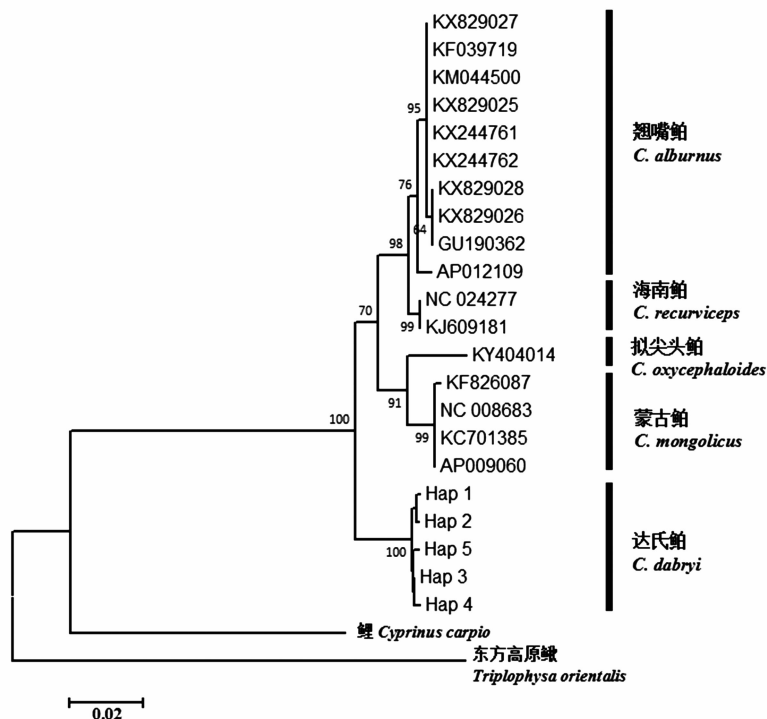


图1 鲌属鱼类基于 *CO I* 基因序列的 NJ 聚类树

类在江湖复合生态系统中的大量分化^[16]。对达氏鲌野生群体的研究表明,所有群体显示出群体间明显的遗传分化。但群体间两两比较 F_{ST} 值和 AMOVA 分析后表明,除丹江口群体外,其余的群体间无明显分化,种群间存在一定的基因流,不同群体间具有共享单倍型。地理隔离、栖息地差异、迁移、人类活动等因素均可能导致群体间出现较大的遗传分化^[23],因而下游鱼类的群落和丰富度对上游及支流鱼类的分布和迁徙起到重要的作用^[24]。达氏鲌自然种群的遗传组成可能与不同群体间的地理位置有关。除丹江口群体外的其他达氏鲌群体依次分布在长江中下游水系,水系间相互连通,可促进不同种群间的基因交流,群体间单倍型共享,可能削弱了地理距离产生的种群间的遗传差异。而丹江口群体位于长江支流的汉江水系上游,该群体可能受到水利工程、水质污染的影响而阻碍了支流上游群体向长江干流中下游的迁移,从而阻碍了其在中下游其他群体间的基因交流。丹江口大坝建成 40 年后对汉江中下游经济鱼类早期资源进行调查,也发现了汉江中下游经济鱼类卵苗径流量明显下降,产卵场数量减少^[25-26],但对于丹江口群体的遗传差异仍需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 陈宜瑜. 中国动物志:硬骨鱼纲鲤形目(中卷)[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 陈清华,刘伟,唐富江. 兴凯湖 4 种野生鲌类营养成分的比较分析[J]. 大连海洋大学学报,2011,26(1):88-92.
- [3] 王琨,程宝晶,刘斌,等. 不同年龄野生和养殖兴凯湖翘嘴鲌肌肉营养成分分析[J]. 中国水产科学,2012,19(5):906-912.
- [4] Skaala O, Hoyheim B, Glover K, et al. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals[J]. Aquaculture,2004,240(1/2/3/4):131-143.
- [5] 杨太有,陈宏喜,刘向奇,等. 丹江口水库翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 海洋与湖泊,2008,39(3):240-244.
- [6] 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报,1998,44(1):82-93.
- [7] 杨建远,张小谷,孙丽群. 江西鄱阳湖达氏鲌生长特征研究[J]. 江西农业大学学报,2009,31(2):336-340.
- [8] 彭居俐,王绪祯,王丁,等. 基于线粒体 *CO I* 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲌属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报,2009,3(2):271-276.
- [9] 王丹,程庆武,杨镇宇,等. 三峡库区鲌属鱼类线粒体 *CO I* 基因遗传多样性的初步分析[J]. 水生生物学报,2015,39(5):1054-1058.
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 3 版. 北京:科学出版社,2002:463.
- [11] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences,2005,360(1462):1847-1857.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(24):4876-4882.
- [13] Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building[J]. Molecular Biology and Evolution,2010,27(2):221-224.
- [14] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution,2013,30(12):2725-2729.
- [15] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of

孔杰,周洲,刘伟,等. 达氏鳊亲鱼群体 mtDNA *Cyt b* 基因和 D-loop 区的序列特征及遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(3): 40-42.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.009

达氏鳊亲鱼群体 mtDNA *Cyt b* 基因和 D-loop 区的序列特征及遗传多样性分析

孔杰,周洲,刘伟,赵凤,王金乐

(贵州省农业科学院水产研究所,贵州贵阳 550025)

摘要:通过对线粒体细胞色素 b(*Cyt b*) 基因和控制区(D-loop)进行序列特征和遗传多样性检测,分析达氏鳊(*Huso dauricus*)亲鱼群体 30 个个体的序列特征及遗传多样性。结果表明,*Cyt b* 基因长 1 138 bp,G+C 含量为 47.03%,共定义单倍型 5 个、多态性位点(S)2 个,简约信息位点 1 个,单倍型多样性指数(H_d)为 0.372,平均核苷酸差异数(K)为 0.384,核苷酸多样性指数(π)为 0.000 34;D-loop 区序列全长 845 bp,G+C 含量为 37.41%,共定义单倍型 6 个,多态性位点 8 个,简约信息位点 3 个,单倍型多样性指数为 0.424,平均核苷酸差异数为 1.069,核苷酸多样性指数为 0.001 27。基于线粒体 D-loop 与 *Cyt b* 序列的研究结果表明,养殖达氏鳊亲鱼群体的遗传多样性偏低,在利用达氏鳊亲鱼进行繁殖育苗时要注意近交的影响。

关键词:达氏鳊;mtDNA;D-loop;*Cyt b*;遗传多样性

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)03-0040-03

达氏鳊(*Huso dauricus*)隶属于硬骨鱼纲辐鳍亚纲鲟科鲟亚科鳊属,是我国重要的大型经济鱼类之一。鲟形目鱼类属于多倍体起源鱼类,种间极易杂交,易造成种质混乱现象,产生种质退化风险。在养殖中,许多单位将自养鲟鱼留作苗种,长期以来忽略了亲鱼选育的遗传背景问题,使得养殖群体近

交的风险增大^[1]。因此,为了抑制养殖群体的种质退化,保证亲鱼群体的遗传力,防止近交衰退造成后代出现成活率降低、长速减慢等问题,有必要了解后备亲鱼群体的遗传多样性。

线粒体 DNA(mitochondrial DNA,简称 mtDNA)具有母系遗传、变异率高、进化速度快、无组织特异性的特点,被广泛应用于水生动物的遗传多样性和分子鉴定研究中,如鳊^[1-2]、鲤^[3]的分子鉴定,鲟鱼^[4-6]、沼虾^[7-8]、裂腹鱼^[9-10]等的遗传多样性研究。mtDNA 的不同区域进化速度存在差异,其中,D-loop 区位于 tRNA^{Pro} 和 rRNA^{Phe} 基因之间的控制区,不参与编码蛋白,是整个 mtDNA 上序列和长度变异最大的区

收稿日期:2017-11-07

基金项目:贵州省科研机构服务企业行动计划(编号:黔科合平台人才[2016]5714);贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2016]2584);现代农业产业技术体系专项资金(编号:CARS-46)。

作者简介:孔杰(1986—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,主要从事水产生物技术相关研究。E-mail:kellykj@126.com。

programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources,2010,10(3):564-567.

[16]He S P, Liu H Z, Chen Y Y, et al. Molecular phylogenetic relationships of Eastern Asian Cyprinidae (Pisces: Cypriniformes) inferred from cytochrome b sequences[J]. Science in China Series C - Life Sciences,2004,47(2):130-138.

[17]Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings. Biological Sciences / the Royal Society,2003,270(1512):313-321.

[18]Schlei O L, Crete - Lafreniere A, Whiteley A R, et al. DNA barcoding of eight North American coregonine species[J]. Molecular Ecology Resources,2008,8(6):1212-1218.

[19]唐伟,朱治任,汪财生,等. 基于 *COI* 基因的 DNA 条形码在蟹科动物鉴定上的应用[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):30-36.

[20]Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLOS Biology,2004,2(10):1657-1663.

[21]施立明. 遗传多样性及其保存[J]. 生物科学信息,1990,2(4):158-164.

[22]王伟,陈立侨,禹娜,等. 应用 *CO II* 基因部分序列分析翘嘴鲌群体的遗传多样性[J]. 大连水产学院学报,2008,23(5):403-408.

[23]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.

[24]He D K, Kang Z J, Tao J, et al. Hydrologic connectivity driven natural stream fish assemblages in mountain streams in the Yangtze River basin: implications for stream fish conservation in monsoonal East Asia[J]. Hydrobiologia,2017,785(1):185-206.

[25]李修峰,黄道明,谢文星. 汉江中游产漂流性卵鱼类产卵场的现状[J]. 大连海洋大学学报,2006,21(2):105-111.

[26]谢文星,黄道明,谢山,等. 丹江口水利枢纽建成后汉江中下游四大家鱼等早期资源及其演变[J]. 水生态学杂志,2009,2(2):44-49.