

唐首杰, 毕 详, 张飞明, 等. 基于线粒体 DNA 控制区序列的团头鲂 3 个选育群体遗传变异分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(20): 191–196. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.044

# 基于线粒体 DNA 控制区序列的团头鲂 3 个选育群体遗传变异分析

唐首杰<sup>1</sup>, 毕 详<sup>2</sup>, 张飞明<sup>2</sup>, 张友良<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学/农业农村部淡水水产种质资源重点实验室/水产科学国家级实验教学示范中心/水产动物遗传育种中心  
上海市协同创新中心, 上海 201306; 2. 上海市松江区水产良种场, 上海 201616)

**摘要:**为从遗传多样性的角度来了解团头鲂 3 个选育群体的选育潜力, 以团头鲂浦江 1 号选育奠基群体( $F_0$ )为对照组, 采用线粒体 DNA 控制区标记评估团头鲂 3 个选育群体的遗传多样性, 分析它们的选育潜力。结果显示, 在 3 个选育群体的 72 条序列中共确定 40 种单倍型, 群体间存在 5 种共享单倍型, 3 个选育群体线粒体 DNA 控制区序列的单倍型多样性( $H$ )范围为 0.670~0.978, 核苷酸多样性( $\pi$ )范围为 0.004 16~0.006 23, 平均核苷酸差异数( $K$ )范围为 3.935~5.960, 群体内核苷酸序列间平均遗传距离范围为 0.003 561~0.004 538, 3 个选育群体的遗传多样性水平( $H$ 、 $\pi$ 、 $K$ )略高于  $F_0$  群体。3 个选育群体间 Kimura 双参数遗传距离和遗传分化指数( $F_{ST}$ )范围分别为 0.004 039~0.004 700 和 0.046 4~0.138 6。3 个选育群体间成对  $F_{ST}$  值差异均显著( $P<0.05$ ), 3 个选育群体与  $F_0$  群体间成对  $F_{ST}$  值差异均极显著( $P<0.01$ )。说明 3 个选育群体的遗传多样性较高, 选育潜力较大; 同时, 选育群体间均存在显著的遗传分化, 可见不同方向上的累代人工选育已在一定程度上改变了选育群体的遗传结构。

**关键词:**团头鲂; 选育群体; 遗传变异; 线粒体 DNA; 遗传多样性

**中图分类号:** S931.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0191-05

在鱼类育种过程中, 维持鱼类选育群体遗传多样性, 一方面可提高选育群体对环境的适应能力和对疾病的抵抗力<sup>[1]</sup>, 另一方面足够的遗传变异水平对保持长期选育过程中的选择反应具有重要作用<sup>[2]</sup>。在实际的鱼类选育工作中, 育种工作者通常采用科学合理的方案对鱼类的重要经济性状进行有计划、有目的的选择, 如保持足够大的亲本群体、创造适宜的养殖环境等。然而, 选育条件下鱼类的繁殖多是在人工控制条件下进行的, 在进行人工繁殖的过程中, 亲本对的选择不可能是完全随机的, 因此, 封闭的选育群体仍可能受到非随机交配、遗传漂变等因素的影响, 从而导致遗传多样性的下降和稀有等位基因的丧失, 并进一步增加近交衰退的风险<sup>[3]</sup>。近年来许多研究显示, 累代人工选育致使鱼类选育群体遗传多样性逐代降低<sup>[4-5]</sup>。Gallardo 等的研究表明, 银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)经连续 4 代人工选育后, 选育群体近交率高达 9.5%, 平均每代近交率约为 2.45%, 近交导致选育群体繁殖力显著下降<sup>[6]</sup>。因此, 在长期的鱼类选育过程中, 及时监测选育群体内遗传变异水平, 保持选育群体的遗传多样性, 是长期选育工作获得最终成功的保证<sup>[7-8]</sup>。

团头鲂浦江 1 号是经 16 年 6 代高强度系统选育而成的首例草食性鱼类选育良种<sup>[9]</sup>。自浦江 1 号审定以来, 上海海洋大学水产种质资源研究室坚持继续选育, 至今已达第 10 代( $F_{10}$ )。鉴于没有永远的良种这一理念和推陈出新的时代要求, 笔者所在研究室在浦江 1 号良种( $F_{10}$ )的基础上, 基于配套系育种理念<sup>[10]</sup>, 以不同选育目标分别建立 3 个团头鲂配套选育系, 并对这 3 个配套育种群体进行连续多代的选育纯化, 而连续世代的选育对选育群体遗传多样性影响程度、3 个选育群体是否存在继续选育的潜力, 至今尚未有精确的遗传检测手段来进行定量评估。

鱼类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 具有分子小、结构简单、进化速度快、遵从母系遗传等特点<sup>[11]</sup>, 而 mtDNA 控制区是整个 mtDNA 序列和长度变异最大的区域, 已被成功应用于褐鳟 (*Salmo trutta*)<sup>[12]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio* L.)<sup>[13]</sup>、红大马哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*)<sup>[14]</sup> 等养殖鱼类种群遗传多样性的检测和评估。

本研究以团头鲂浦江 1 号选育奠基群体( $F_0$ )为对照组, 通过 mtDNA 控制区序列变异来评估团头鲂 3 个选育群体的遗传多样性和遗传结构, 分析它们的选育潜力, 为选育群体遗传性能的保护提供依据, 并为下一步配套系选育工作提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

对照组为团头鲂浦江 1 号选育奠基群体( $F_0$ ), 系 1985 年淤泥湖团头鲂原种在上海海洋大学鱼类种质研究试验站自繁

收稿日期: 2018-07-18

基金项目: 上海市种业发展项目 [编号: 沪农科种字 (2017) 第 1-9 号]; 上海市科技兴农重点攻关项目 [编号: 沪农科攻字 (2013) 第 2-3 号]; 国家自然科学基金重点项目 (编号: 30630051)。

作者简介: 唐首杰 (1981—), 男, 江苏常州人, 博士, 讲师, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究。Tel: (021) 61900468; E-mail: sjtang@shou.edu.cn。

的后代;试验组为 3 个团头鲂选育群体,其来源和性质如下:(1)选育群体 A(以下简称 A),团头鲂浦江 1 号选育系  $F_{10}$ ;(2)选育群体 B(以下简称 B),以人工诱导异源四倍体群体(团头鲂浦江 1 号♀×三角鲂♂)<sup>[15]</sup>为奠基群体,经群体选育的第 3 代( $F_3$ );(3)选育群体 C(以下简称 C),以团头鲂连续 2 代人工诱导减数分裂雌核发育群体<sup>[16]</sup>为奠基群体,经群体选育的第 3 代( $F_3$ )。对照组群体采自上海海洋大学鱼类种质研究试验站,试验组群体均采自上海市松江区水产良种场。群体 A、群体 B 和群体 C 的采样数均为 24 尾, $F_0$  群体采样 12 尾,剪取每尾试验鱼的尾鳍,编号后于 95% 乙醇中保存备用。前期采样工作于 2017 年 1 月完成,后续实验室分析工作于 2017 年 7—9 月在上海海洋大学淡水水产种质资源重点实验室完成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 提取采用常规的酚/三氯甲烷法<sup>[17]</sup>进行。

1.2.2 线粒体 DNA 控制区引物设计 团头鲂线粒体 DNA 控制区(D-loop 区)位于转脯氨酸(tRNA-Pro)基因和转苯丙氨酸(tRNA-Phe)基因之间,根据 GenBank 中已报道的团头鲂线粒体 DNA 全序列(登录号为 NC\_010341.1),利用在线引物设计软件 Primer3<sup>[18]</sup>设计 D-loop 区的正向引物和反向引物。引物序列及退火温度见表 1。所有引物均由生工生物工程(上海)技术服务有限公司合成。

表 1 团头鲂线粒体 DNA 控制区的引物序列和退火温度			
扩增区段	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	片段大小 (bp)
控制区	F:GGCTCCCAAAGCCAGAAT	56.4	1 033
	R:TTCTCAGGGCCCATCTTAAC		

注:F 为正向引物;R 为反向引物。

1.2.3 PCR 扩增及检测 PCR 扩增反应在 Eppendorf Mastercycler gradient PCR 仪上进行,样品的反应总体积为 50 μL,包括正向引物 2.5 μL(5 μmol/L)、反向引物 2.5 μL(5 μmol/L)、2×PCR Reagent 25 μL、DNA 模板 1 μL、无菌水 19 μL;PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56.4℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。

取 2 μL 扩增产物经 1.5% 进口分子生物学级琼脂糖凝胶(含 0.5 g/mL EB)电泳,电泳缓冲液为 0.5×TBE,电压为 5 V/cm,经 1.5 h 后,用 Gene Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析。

1.2.4 DNA 序列测定 所有样品委托生工生物工程(上海)技术服务有限公司进行纯化和单向测序,测序引物为控制区的正向引物(F),序列测定仪为美国 ABI 公司 PRISM 3730 型全自动序列分析仪。

1.3 数据处理和分析

用 BLAST 软件<sup>[19]</sup>搜索 GenBank 中团头鲂(*Megalobrama amblycephala*,序列登录号为 NC\_010341.1)的线粒体 DNA 控制区序列,与本试验测得的团头鲂相应序列结果进行同源性比较;然后用 BioEdit 软件<sup>[20]</sup>对测序结果进行编辑,用 Clustal W 软件<sup>[21]</sup>进行序列重排和同源比较,并进行人工核对校正。

用 DNAsp 4.10 软件<sup>[22]</sup>计算多态位点数、单倍型多样性(haplotype diversity,  $H$ )<sup>[23]</sup>、核苷酸多样性(nucleotide diversity,  $\pi$ )<sup>[24]</sup>和平均核苷酸差异数(average number of nucleotide differences,  $K$ ),序列变异中性检验(neutrality test)用 Tajima 的 D 统计检验<sup>[25]</sup>。单倍型多样性( $H$ )和核苷酸多样性( $\pi$ )计算公式如下:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right);$$

$$\pi = \frac{n}{L(n-1)} \sum_{j=1}^L \left(1 - \sum_{i=1}^k x_{ij}^2\right).$$

式中: $n$  为群体样本大小; $p_i$  为第  $i$  个单倍型在群体中出现的频率; $k$  为单倍型数目; $x_{ij}$  为第  $i$  个核苷酸(A、G、C 或 T)在序列中的第  $j$  位点上的频率; $L$  为序列的长度。

用 Arlequin 3.01 软件<sup>[26]</sup>估测群体间成对  $F_{ST}$  值<sup>[27]</sup>,并利用置换检验法进行显著性检验(重复次数为 1 000)。

采用分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)估算各群体间和群体内的遗传变异及分化水平。通过 3 种分子遗传变量进行分析: $F_{ST}$  为群体内个体之间的遗传变异; $F_{SC}$  为组内各群体间的变异程度; $F_{CT}$  为不同组别之间的遗传变异程度。并用置换检验法进行 1 000 次重复模拟计算,以上运算在 Arlequin 3.01 软件<sup>[26]</sup>中完成。

用 MEGA 4.0 软件包<sup>[28]</sup>根据 Kimura Two-Parameter 法<sup>[29]</sup>计算群体内和群体间核苷酸序列的两两间遗传距离,用非加权配对算术平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)和邻接法(neighbour-joining method, NJ)构建群体间的分子系统树(kimura two-parameter 法估算遗传距离)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物序列测定及排序结果

4 个团头鲂群体共 84 个个体的线粒体 DNA 控制区片段的 PCR 扩增产物经纯化后测序,各扩增片段经同源重排后的长度(不包括插入/缺失)为 962 bp。

2.2 4 个团头鲂群体的遗传结构

2.2.1 群体内遗传多样性分析 4 个团头鲂群体内的单倍型分布及频率见表 2。在所分析的 84 条序列中,确定了 46 种单倍型, $F_0$  群体与其他 3 个选育群体间无共享单倍型,3 个选育群体间存在 5 种共享单倍型,其中单倍型 H1 为 A 群体、B 群体和 C 群体所共享,单倍型 H10 为 A 群体和 C 群体所共享,单倍型 H13、H17 和 H18 为 B 群体和 C 群体所共享。 $F_0$  群体中出现频率最高的单倍型为 H41, H1 分别为 A 群体、B 群体和 C 群体中出现频率最高的单倍型。

4 个团头鲂群体内的遗传多样性参数见表 3。各群体内单倍型数范围为 6~19,其中 C 群体的单倍型数最多, $F_0$  群体的单倍型数最少。4 个团头鲂群体内线粒体 DNA 控制区的单倍型多样性( $H$ )在 0.670~0.978 之间,其中 C 群体的单倍型多样性最高,A 群体的单倍型多样性最低,单倍型多样性在 4 个群体中的变化趋势由高到低依次为 C 群体>B 群体> $F_0$  群体>A 群体。

4 个团头鲂群体内线粒体 DNA 控制区核苷酸多态位点数在 1~22 之间,核苷酸多样性( $\pi$ ) 在 0.002 67~0.006 23

表 2 4 个团头鲂群体单倍型分布及频率

单倍型	在各群体中的分布			
	F <sub>0</sub>	A	B	C
H1	14(0.583 3)	4(0.166 7)	3(0.125 0)	
H2	1(0.041 7)			
H3	1(0.041 7)			
H4	1(0.041 7)			
H5	1(0.041 7)			
H6	1(0.041 7)			
H7	1(0.041 7)			
H8	1(0.041 7)			
H9	1(0.041 7)			
H10	1(0.041 7)		2(0.083 3)	
H11	1(0.041 7)			
H12		1(0.041 7)		
H13		2(0.083 3)	2(0.083 3)	
H14		1(0.041 7)		
H15		1(0.041 7)		
H16		2(0.083 3)		
H17		2(0.083 3)	1(0.041 7)	
H18		2(0.083 3)	1(0.041 7)	
H19		1(0.041 7)		
H20		2(0.083 3)		
H21		1(0.041 7)		
H22		1(0.041 7)		
H23		1(0.041 7)		
H24		1(0.041 7)		
H25		1(0.041 7)		
H26		1(0.041 7)		
H27			1(0.041 7)	
H28			1(0.041 7)	
H29			2(0.083 3)	
H30			1(0.041 7)	
H31			1(0.041 7)	
H32			1(0.041 7)	
H33			1(0.041 7)	
H34			1(0.041 7)	
H35			1(0.041 7)	
H36			1(0.041 7)	
H37			1(0.041 7)	
H38			1(0.041 7)	
H39			1(0.041 7)	
H40			1(0.041 7)	
H41	7(0.583 3)			
H42	1(0.083 3)			
H43	1(0.083 3)			
H44	1(0.083 3)			
H45	1(0.083 3)			
H46	1(0.083 3)			

之间,平均核苷酸差异数(*K*)的范围为 2.485~5.960;群体内个体间平均核苷酸差异数和核苷酸多样性在 4 个群体中的变化趋势一致,即 C 群体>B 群体>A 群体>F<sub>0</sub> 群体。A 群体的多态位点数最多(22 个),F<sub>0</sub> 群体的多态位点数最少(11 个)。3 个团头鲂选育群体 Tajima's D 中性检验均不显著,符合中性突变。

总体而言,C 群体遗传多样性水平最高,F<sub>0</sub> 群体遗传多样性水平最低,3 个团头鲂选育群体遗传多样性水平高于 F<sub>0</sub> 群体。

2.2.2 群体间遗传距离和遗传分化 如表 4 所示,4 个团头鲂群体内线粒体 DNA 控制区核苷酸序列间的平均遗传距离在 0.002 526~0.004 538 之间,在 4 个群体间的变化趋势为 C 群体>B 群体>A 群体>F<sub>0</sub> 群体,这与上文中的核苷酸多样性( $\pi$ )、平均核苷酸差异数(*K*)的分析结果一致。

4 个团头鲂群体间的平均遗传距离在 0.004 039~0.006 140 之间,F<sub>0</sub> 群体与 C 群体间的遗传距离最大,为 0.006 140,A 群体与 B 群体间的遗传距离最小,为 0.004 039。对于 3 个选育群体而言,A 群体与 C 群体间遗传距离最大,为 0.004 700。

如表 5 所示,群体间的遗传分化指数(*F<sub>ST</sub>*) 在 0.046 4~0.396 7 之间,F<sub>0</sub> 群体与 C 群体之间的遗传分化指数最高,为 0.396 7,B 群体与 C 群体之间的遗传分化指数最低,为 0.046 4。从群体间显著分化的 *P* 值(0.000 0~0.036 0)可以推断,群体间成对 *F<sub>ST</sub>* 值差异均显著(*P*<0.05),表明所有群体间均存在显著的遗传分化。

2.2.3 分子方差分析(AMOVA) 本研究对 4 个团头鲂群体进行分组(1 个组、2 个组、3 个组),从不同角度对群体遗传变异进行分子方差分析(AMOVA)。结果(表 6)显示,在任何一种分组条件下,*F<sub>ST</sub>* 值都达到了极显著水平(*P*<0.01),说明群体内个体间的遗传分化极显著。当把所有群体分成 2 个组或 3 个组时,*F<sub>SC</sub>* 值均达到显著(*P*<0.05)或极显著水平(*P*<0.01),表明群体间存在显著或极显著的遗传分化,这证实了群体间遗传分化指数(*F<sub>ST</sub>* 值)的分析结果。将 4 个群体分成 2 个组时,4 个群体在 2 种分组模式下(模式 1:F<sub>0</sub> 群体为一组,其余群体为另一组;模式 2:F<sub>0</sub> 群体和 A 群体为一组,B 群体和 C 群体为另一组),*F<sub>CT</sub>* 值达到了极显著水平(*P*<0.01),表明组别之间存在极显著的遗传分化。将 4 个群体分成 3 个组时,仅在 1 种分组模式下(F<sub>0</sub> 群体为第 1 组,A 群体为第 2 组,B 群体和 C 群体为第 3 组),*F<sub>CT</sub>* 值达到显著水平(*P*<0.05)。此外,在其他分组模式下,*F<sub>CT</sub>* 值均未达到显著水平。

2.2.4 聚类分析 如图 1 所示,因聚类方法的差异,2 种聚类图显示了各自的特点,很难说哪种聚类图最能反映真实的群体间遗传关系,但 2 种聚类图均显示,B 群体和 C 群体可被聚为一类,F<sub>0</sub> 群体和 B 群体间聚类关系较远,这也验证了上文中分子方差分析的结果。

3 讨论与结论

3.1 团头鲂 3 个选育群体的遗传多样性分析

遗传多样性是鱼类育种群体具有选育潜力的物质基础,只有保持选育群体的遗传多样性,才能获得持续的遗传进展,从而保证鱼类选育工作的持续开展。线粒体 DNA 标记是评价鱼类群体遗传多样性水平的有效工具之一<sup>[30]</sup>,以线粒体 DNA 序列变异为基础估算的单倍型多样性、核苷酸多样性等参数是衡量群体遗传多样性的重要参数。单倍型多样性是指从样本中随机抽取到 2 个不同单倍型的频率<sup>[23]</sup>,单倍型多样性越高,说明群体内遗传多样性水平越高。Nei 等将核苷酸多样性定义为给定群体中随机选取的 DNA 序列间平均每个

表 3 4 个团头鲂群体内的遗传多样性

群体	单倍型数	单倍型多样性 ( <i>H</i> )	多态位点数 ( <i>S</i> )	核苷酸多样性 ( $\pi$ )	平均核苷酸差异数 ( <i>K</i> )	中性检验	
						Tajima's D	<i>P</i> 值
F <sub>0</sub>	6	0.682 ± 0.148	11	0.002 67 ± 0.000 80	2.485	-1.573 96	0.05 < <i>P</i> < 0.10
A	11	0.670 ± 0.111	22	0.004 16 ± 0.001 23	3.935	-1.221 79	<i>P</i> > 0.10
B	16	0.960 ± 0.024	15	0.004 79 ± 0.000 35	4.587	0.251 26	<i>P</i> > 0.10
C	19	0.978 ± 0.019	21	0.006 23 ± 0.000 62	5.96	-0.119 33	<i>P</i> > 0.10

表 4 4 个团头鲂群体的群内及群间平均遗传距离

群体	平均遗传距离			
	F <sub>0</sub>	A	B	C
F <sub>0</sub>	0.002 526			
A	0.004 184	0.003 561		
B	0.005 180	0.004 039	0.003 631	
C	0.006 140	0.004 700	0.004 283	0.004 538

表 5 4 个团头鲂群体间遗传分化指数

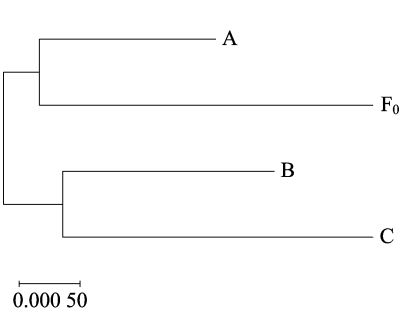
群体	F <sub>0</sub>	A	B	C
F <sub>0</sub>		0.257 2	0.387 7	0.396 7
A	0.000 0		0.110 1	0.138 6
B	0.000 0	0.000 0		0.046 4
C	0.000 0	0.000 0	0.036 0	

注: 对角线上数值为成对 *F<sub>ST</sub>* 值, 对角线下为 *P* 值。

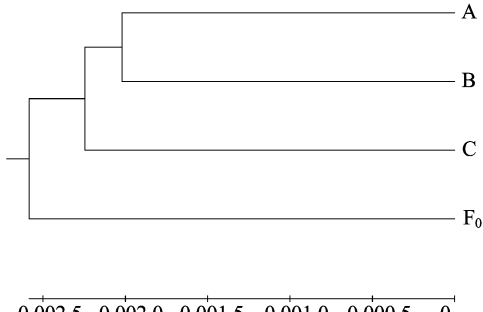
表 6 4 个团头鲂群体间遗传差异的分子方差分析 (AMOVA)

分组	变异率 (%)			固定指数		
	群体内	组内群体间	组间	<i>F<sub>ST</sub></i>	<i>F<sub>SC</sub></i>	<i>F<sub>CT</sub></i>
未分组 (所有 4 个群体归为 1 个组)	80.06	19.94		0.199 4 **		
2 个组 (1. F <sub>0</sub> ; 2. A、B、C)	66.19	7.82	25.99	0.338 1 **	0.105 7 **	0.259 9 **
2 个组 (1. F <sub>0</sub> 、A; 2. B、C)	77.05	11.65	11.30	0.229 5 **	0.131 4 **	0.113 0 **
2 个组 (1. F <sub>0</sub> 、B; 2. A、C)	82.66	27.05	-9.71	0.173 4 **	0.246 6 **	-0.097 1 ns
2 个组 (1. F <sub>0</sub> 、C; 2. A、B)	83.33	28.91	-12.25	0.166 7 **	0.257 6 **	-0.122 5 ns
2 个组 (1. F <sub>0</sub> 、A、B; 2. C)	81.13	21.87	-3.00	0.188 7 **	0.212 3 **	-0.030 0 ns
2 个组 (1. F <sub>0</sub> 、A、C; 2. B)	84.72	28.37	-13.09	0.152 8 **	0.250 8 **	-0.130 9 ns
2 个组 (1. F <sub>0</sub> 、B、C; 2. A)	84.96	28.79	-13.75	0.150 4 **	0.253 1 **	-0.137 5 ns
3 个组 (1. F <sub>0</sub> ; 2. A; 3. B、C)	76.71	4.42	18.88	0.232 9 **	0.054 4 *	0.188 8 *
3 个组 (1. F <sub>0</sub> ; 2. A、B; 3. C)	77.74	9.18	13.08	0.222 6 **	0.105 7 **	0.130 8 ns
3 个组 (1. F <sub>0</sub> ; 2. A、C; 3. B)	78.80	14.08	7.12	0.212 0 **	0.151 6 **	0.071 2 ns
3 个组 (1. F <sub>0</sub> 、A; 2. B; 3. C)	80.41	23.46	-3.86	0.195 9 **	0.225 8 **	-0.038 6 ns
3 个组 (1. F <sub>0</sub> 、B; 2. A; 3. C)	82.55	45.42	-27.98	0.174 5 **	0.354 9 **	-0.279 8 ns
3 个组 (1. F <sub>0</sub> 、C; 2. A; 3. B)	83.76	57.81	-41.57	0.162 4 **	0.408 3 **	-0.415 8 ns

注: \*, \*\* 分别表示在 0.05、0.01 水平差异显著, ns 表示无显著性 (*P* > 0.05)。



a. NJ 聚类图示



b. UPGMA 聚类图示

图 1 基于群体间遗传距离的 4 个团头鲂群体间 NJ 聚类图示和 UPGMA 聚类图示

苷酸多样性)均高于草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[5]</sup>、松浦鲤(*C. carpio* ‘Songpu Carp’)<sup>[31]</sup>、奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)<sup>[32]</sup>、褐鲮(*Salmo trutta*)<sup>[12]</sup>、鲤(*C. carpio* L.)<sup>[13]</sup>、红大马哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)<sup>[14]</sup>等鱼类的选育群体的相应参数。综上所述,本研究中的 3 个团头鲂选育群体历经多代选育后仍保持着较高水平的遗传多样性,对其进行进一步的选育纯化和种质资源聚合利用的潜力较大。

### 3.2 团头鲂 3 个选育群体间的遗传分化

遗传分化在本质上是基因频率的概率变化及其杂合性变化的度量<sup>[33]</sup>,而人工定向选育通过改变群体的基因频率来促使遗传分化的产生。遗传分化指数( $F_{ST}$ )常用于度量群体间遗传分化的相对大小,其数值越大,表明 2 个群体间的遗传分化水平越高。本研究中,3 个选育群体间遗传分化指数( $F_{ST}$ )为 0.046 4~0.138 6,显著性检验结果均显示( $P < 0.05$ ),群体间遗传分化已达显著水平,此外,选育奠基群体  $F_0$  与 3 个选育群体间的遗传分化指数( $F_{ST}$ )为 0.257 2~0.396 7,显著性检验结果也显示,3 个选育群体与  $F_0$  群体间遗传分化已达极显著水平( $P < 0.01$ )。以上结果表明,不同方向上的累代人工选育在一定程度上改变了选育群体的遗传结构,使之产生了不同方向的变化,而这种现象正是育种工作者希望看到的结果,因为通过连续多代的选育纯化,可以使选育群体遗传结构逐步趋向稳定,为配套系育种提供优异亲本。

### 3.3 选育群体间种质资源聚合利用探讨

杂种优势利用是鱼类配套系育种的重要课题之一,也是鱼类优异种质资源聚合利用的基础,准确预测杂种优势对加快配套系选育进程具有重要意义。一般而言,杂种优势大小与相互杂交的 2 个亲本群体间的遗传差异直接相关。亲本群体之间的遗传差异越大,杂交后代就越可能获得杂种优势。亲本群体之间的遗传距离是衡量亲本间遗传差异的一个重要指标,遗传距离越大,杂交后代的杂种优势就越强<sup>[34]</sup>。在本研究中,对于 3 个选育群体而言,群体间 Kimura 双参数遗传距离显示,A 群体与 C 群体间遗传距离最大,为 0.004 700,A 群体和 B 群体间的遗传距离最小,为 0.004 039。由此可以预测,A 群体与 C 群体进行群体间杂交可能获得较明显的杂种优势,然而 A 群体和 B 群体间杂交后代的杂种优势可能较小。以上结果为团头鲂选育群体优异种质资源的聚合利用提供了参考。

### 参考文献:

- [1] Gamfeldt L, Kallstrom B. Increasing intraspecific diversity increases predictability in population survival in the face of perturbations[J]. *Oikos*, 2007, 116(4): 700–705.
- [2] Davis G P, Hetzel D J S. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species[J]. *Aquaculture Research*, 2000, 31(1): 3–10.
- [3] Hartl D L, Clark A G. Principles of population genetics[M]. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997: 176–177.
- [4] 颜晓勇, 李思发, 蔡完其. 基于 D-Loop 序列的罗非鱼选育群体遗传变异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 336–341.
- [5] 王沈同, 张 猛, 党云飞, 等. 草鱼野生与选育群体线粒体 DNA 控制区 D-loop 遗传变异分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41(5): 947–955.

- [6] Gallardo J A, García X, Lhorente J P, et al. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of *Coho salmon* selected using BLUP predictors of breeding values[J]. *Aquaculture*, 2004, 234(1/2/3/4): 111–122.
- [7] Campton D E. Sperm competition in salmon hatcheries: the need to institutionalize genetically benign spawning protocols: response to comment[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2005, 133(6): 1495–1498.
- [8] Coimbra J. Modern aquaculture in the coastal zone: lessons and opportunities[M]. Netherlands: IOS Press, 2015: 212–230.
- [9] Li S F, Cai W Q. Genetic improvement of the herbivorous blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Naga*, 2003, 26(1): 20–23.
- [10] 张 沅. 家畜育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 230–254.
- [11] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1/2/3/4): 1–37.
- [12] Kohout J, Jaskova I, Papousek I, et al. Effects of stocking on the genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, in Central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers[J]. *Fisheries Management and Ecology*, 2012, 19(3): 252–263.
- [13] Napora – Rutkowski L, Rakus K, Nowak Z, et al. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains breed in Poland based on microsatellite, AFLP, and mtDNA genotype data[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 433–442.
- [14] Yamamoto S, Kitamura S, Sakano H, et al. Genetic structure and diversity of Japanese kokanee *Oncorhynchus nerka* stocks as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA markers[J]. *Journal of Fish Biology*, 2011, 79(5): 1340–1349.
- [15] 邹曙明. 团头鲂人工同源和异源四倍体的繁育群体建立及其不同倍性后代的生物学特征分析[D]. 上海: 上海水产大学, 上海海洋大学, 2004: 69–79.
- [16] 李思发, 杨怀宇, 邹曙明. 快速近交对团头鲂遗传结构的影响和近交效应的估算[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 161–165.
- [17] Sambrook J, Russell 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: 1730–1732.
- [18] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2000, 132: 365–386.
- [19] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [20] Hall T A. BioEdit: a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1998, 41: 95–98.
- [21] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [22] Rozas J, Sánchez – Delbarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496–2497.
- [23] Nei M, Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases[J]. *Genetics*, 1981, 97(1): 145–163.

高静雯,曾宗波,武磊,等. 新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的临床及实验室诊断[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):196-199.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.045

# 新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的临床及实验室诊断

高静雯<sup>1</sup>, 曾宗波<sup>1</sup>, 武磊<sup>2</sup>, 张莉<sup>1</sup>, 齐亚银<sup>1</sup>

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000; 2. 克拉玛依瑞恒畜牧开发有限责任公司, 新疆克拉玛依 834000)

**摘要:**为查明导致新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的主要致病菌及其发病原因,首先进行了现场流行病学调查,后对 20 头奶驴(13 头患乳房炎,7 头健康)的血常规进行检测,并无菌采集 13 头临床型奶驴乳房炎的奶样,采用常规微生物学方法进行病原菌的分离鉴定及药敏试验。研究表明,本次乳房炎的发生与奶驴营养不良和养殖环境息息相关,其中乳房炎组与健康组相比,血红蛋白、红细胞、淋巴细胞、粒细胞比例等均有所下降,其余指标变化不明显。同时,从乳汁中共分离鉴定到 16 株细菌,其中大肠杆菌 13 株,链球菌 3 株;药敏试验结果表明,大肠杆菌对链霉素、恩诺沙星、氟苯尼考的敏感率都在 75% 以上,对  $\beta$ -内酰胺类药物耐药率在 60% 以上;链球菌对青霉素、氨苄西林、氟苯尼考的敏感率都在 60% 以上,但对恩诺沙星耐药率达到 100%。研究结果揭示,尽管关于奶驴乳房炎发病率的报道较少,但通过本次试验发现,在生产环节中各种细菌对奶驴乳房炎的威胁不容小觑,且本次分离到的病原菌已经表现出比较严重的耐药性。

**关键词:**驴;乳房炎;生化鉴定;药敏试验;血细胞分析

**中图分类号:** S858.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0196-04

乳房炎是奶牛和奶山羊的常见高发病,产奶驴也有发生,以乳房发热、肿胀、疼痛、乳汁不通为主<sup>[1]</sup>。驴乳房炎,主要是由于驴乳腺受微生物、物理、化学和环境等因素刺激从而产生的一类炎症反应。驴和其他马属动物一样,哺乳期能产奶,奶驴泌乳期一般可达到 7~8 个月,驴的产乳量:驴产奶因品种不同标准不一,产后 1.5~4 个月处于高产期,日单产最高可达 3.5~4.0 kg,平均 1.5~1.8 kg<sup>[2]</sup>。驴奶具有较高的开发利用价值,Malacarne 等发现驴奶具有极高的营养价值,其

主要成分与人奶非常相近,可作为人乳的替代品,同时还具有较高的药用价值,《本草纲目》中记载:“驴乳,气味甘,冷利,无毒,热频饮之可治气郁,解小儿热毒,不生痘疹”<sup>[3]</sup>。因此,驴乳房炎不仅对养殖户造成严重的经济损失,更对动物性食品安全与畜牧行业的发展造成了巨大的安全隐患。

2018 年 6 月,新疆某规模化驴场在采集驴奶时发现驴奶出现异常,其中有 13 头驴出现典型乳房炎症状,奶汁呈絮状,黄褐色泛黑。驴乳房炎给驴场带来了奶产量和奶质量降低、驴奶的废弃,甚至患驴的淘汰等较大的经济损失。本研究对该规模化驴场中病驴进行驴乳房炎致病菌的分离鉴定,并对这 13 头采样驴和 7 头健康驴进行血细胞成分分析测定,旨在明确引起驴乳房炎的主要病原菌种类,并探讨乳房炎患驴和健康驴血细胞成分的关系。

收稿日期:2018-07-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31760737)。

作者简介:高静雯(1994—),女,新疆伊犁人,硕士,动物传染病预防与防治。E-mail:993447409@qq.com。

通信作者:齐亚银,博士,副教授,主要从事动物传染病诊断与防治工作。E-mail:qiyayin@163.com。

[24] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10):5269-5273.

[25] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123(3):585-595.

[26] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2007, 23:47-50.

[27] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies[J]. Genetics, 1995, 139(1):457-462.

[28] 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.

[29] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2):111-120.

[30] 刘占江. 水产基因组学技术[M]. 鲍宝龙, 王志勇, 张士璠, 等译. 北京:化学工业出版社, 2011:44-47.

[31] 单云晶, 鲁翠云, 李超, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的 5 种鲤养殖品种遗传多样性研究[J]. 中国水产科学, 2013, 20(5):931-938.

[32] 何福玲, 凌正宝, 肖俊, 等. 两个人工选择奥利亚罗非鱼群体系统发育及其遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(2):341-349.

[33] 顾万春. 统计遗传学[M]. 北京:科学出版社, 2004:191-192.

[34] Dong Z, Zhou E. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. Aquaculture Research, 1998, 29(8):595-600.