

谢启明,柯瑞林,刘帆,等. 基于线粒体 D-loop 区分析安徽省 5 个翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2021,49(9):143-147.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.09.026

基于线粒体 D-loop 区分析安徽省 5 个翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性

谢启明,柯瑞林,刘帆,苏时萍

(安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036)

摘要:为研究安徽省鳊鱼的遗传多样性,对安徽省内 5 个鳊鱼养殖群体共 125 个样本的线粒体 D-loop 区进行了扩增和测序分析。试验最终共获得 125 条长度为 858 bp 的 D-loop 区序列,共检出 260 个变异位点,包括 77 个简约信息位点和 183 个单核苷酸变异位点;碱基平均含量为 T(29.3%)、C(20.6%)、A(33.8%) 和 G(16.2%),具有明显的(A+T)碱基偏移。5 个群体的遗传多样性较低($H_{d,mean} = 0.596$, $P_{i,mean} = 0.053$),可能经历了瓶颈事件。此外,通过对群体遗传结构及邻接法系统发育树的分析发现,5 个养殖群体未表现出明显地理聚集,不同群体间有少量个体混合。群体变异主要来自于群体内部而非群体间。本研究可为鳊鱼种质资源的保护和恢复提供理论依据。

关键词:鳊(*Siniperca chuatsi*);线粒体基因组;D-loop 区;遗传多样性

中图分类号: S932.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)09-0143-05

鳊(*Siniperca chuatsi*),隶属硬骨鱼纲、鲈形目、鲈形科、鳊亚科、鳊属,广泛分布于中国南部,是一种具有较高经济价值的特色鱼类。安徽省是内陆渔业大省,拥有全国第二大的水域总面积,水域生态良好、水产资源丰富,水产品产量稳居全国前四。近年,安徽省一直在大力推进绿色生态养殖和特色水产品产业,及渔业产业经济体系的转型。安徽省作为翘嘴鳊的两大主产地之一,具有得天独厚的优势。然而天然水域的破坏和过度商业捕捞,使得鳊鱼的野生资源迅速减少,并且大规模的集中养殖又缺乏充足的亲本补充,常常发生近亲繁殖,使得生产性状退化,种质资源丢失。为缓解种质质量与生产需求间的矛盾,改良生产性状,提高经济效益,并为优良品种的选育提供科学依据,开展鳊种群遗传多样性与群体结构的分析非常重要。

遗传多样性是生物进化与适应环境的物质基础,其丰富程度反映了生物的进化与适应潜力的强弱。近年来,已有不少关于鳊鱼遗传多样性的研

究。如胡玉婷等基于线粒体 *Cyt b* 基因分析了安徽省养殖黄金鳊(翘嘴鳊选育种)群体与 3 个野生翘嘴鳊群体的遗传多样性,结果表明,4 个群体具有较高的单倍型多样性和较低的核苷酸遗传多样性并发生了遗传分化^[1]。曾庆凯等基于 10 对微卫星引物分析了 3 个野生翘嘴鳊群体的遗传多样性,得到了相似的结果^[2]。颜元杰等基于 20 对微卫星引物分析了江苏省 6 个野生翘嘴鳊群体,结果表明其具有较高的遗传多样性^[3]。然而,有关安徽省翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性研究并不多见。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是一种理想的分子标记,具有无重组、多拷贝无内含子等特点^[4]。mtDNA 的不同区域具有不同的进化速率,如进化速率较低的 12S rDNA、16S rDNA 等用于科的标记;进化速率适中的 *Cyt b*、*CO I* 用于属、种的标记;进化速率较高的 D-loop 区用于种群内部的标记^[5]。

本研究基于能够反映种群内部遗传多样性的线粒体 D-loop 区引用,分析来自安徽省的 5 个翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性与群体结构,旨在为翘嘴鳊的品种选育与改良工作提供理论基础。

1 材料与方

1.1 试验材料

翘嘴鳊样品均采集自安徽省内,包括肥东县管

收稿日期:2020-09-30

基金项目:农业农村部物种资源保护项目(渔业)(编号:kj20180187);安徽省水产产业体系建设专项(编号:[2016]84)。

作者简介:谢启明(1996—),男,安徽人,硕士研究生,主要从事水产动物遗传资源研究。E-mail:2188149989@qq.com。

通信作者:苏时萍,博士研究生,副教授,主要从事水产动物遗传资源研究。E-mail:sushiping@ahau.edu.cn。

湾水产养殖场(GW)、池州市秋浦特种水产开发有限公司(QP)、安庆市皖宜季牛水产养殖场(AQ)、滁州市隆财渔业有限公司(CZ)和明光市广源水产养

殖场(MG),共5个群体,每个群体25个样本,取背部肌肉组织于无水乙醇中4℃保存。

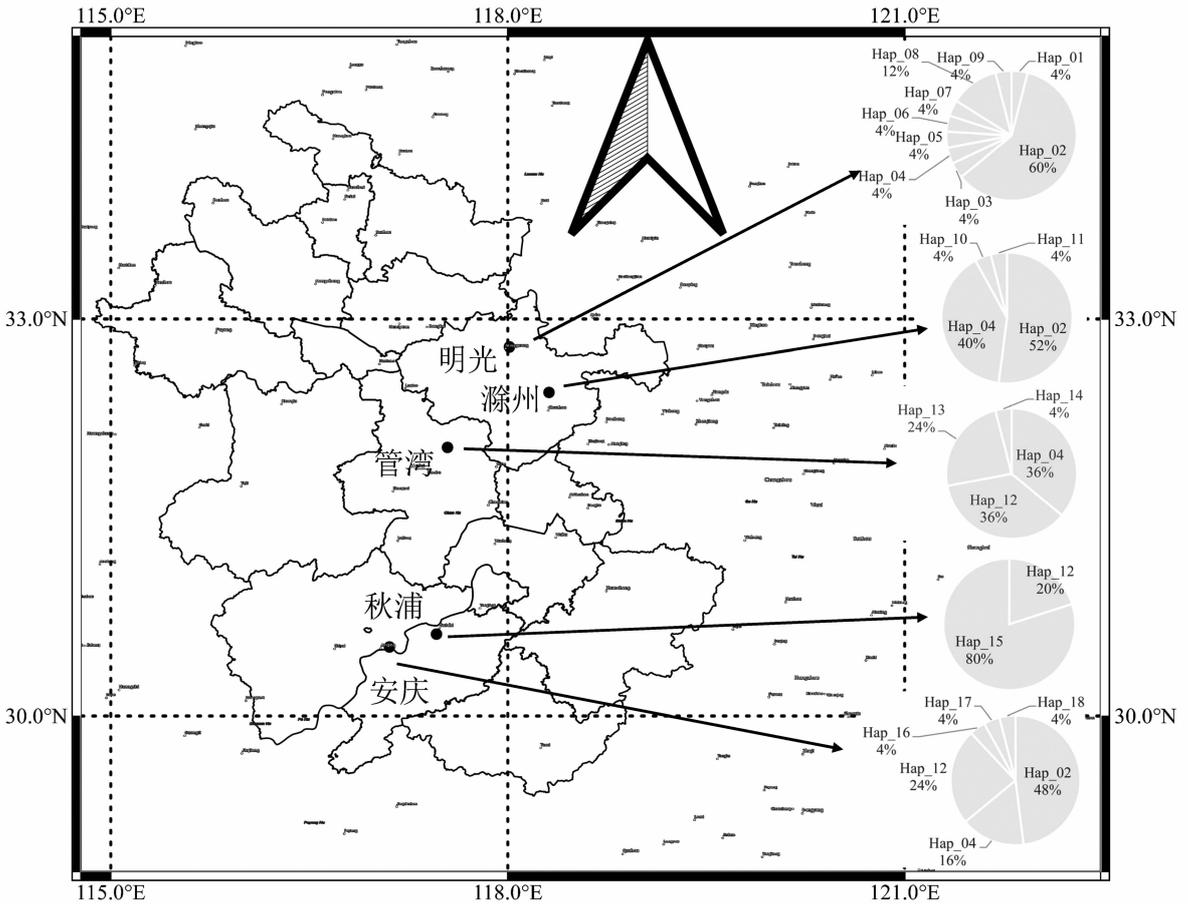


图1 5个翘嘴鲌养殖群体采样地点与单倍型分布

1.2 方法

1.2.1 翘嘴鲌线粒体DNA的抽提 翘嘴鲌肌肉组织使用上海诺伦生物医药技术有限公司(LG-0107)新鲜动物组织和细胞线粒体DNA抽提试剂盒抽提线粒体DNA, -20℃保存。

1.2.2 翘嘴鲌D-loop区的扩增、测序 翘嘴鲌D-loop区引物设计以NCBI:NC_015822为模板,使用Primer 5.0设计引物。F:5'-CCCAAAGCTAGGATTGTAAC-3';R:5'-CGGATACTTGCATGTGTAA G-3',委托上海桑尼生物科技有限公司合成。

PCR扩增使用50 μL体系:Premix Taq(TaKaRa Taq Version 2.0 plus dye)(25 μL),20 μmol/μL的上游引物(1 μL),20 μmol/μL的下游引物(1 μL),DNA模板(2 μL),ddH₂O补充至50 μL。

扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;

最后一个循环结束后,72℃延伸10 min。

PCR扩增产物经凝胶电泳初步确定片段长度后,由上海桑尼生物科技有限公司进行产物纯化、测序。

1.2.3 遗传多样性和群体分化分析 序列的比对和碱基组成使用MEGAX^[6]分析。序列的变异位点、核苷酸多样性(P_i)、单倍型多样性(H_d)、基因流(N_m)和分化系数(F_{ST})使用DNAsp 5.0分析^[7]。分子变异分析(A-MOVA)使用PopART8分析。

1.2.4 群体结构分析 单倍型网络图使用PopART^[8]构建。邻接法系统进化树使用MEGAX6构建,并进行1000次的Boot strap检验。

2 结果

2.1 遗传多样性和群体分化分析

测序返回的序列数据经人工校正、比对去除两

端冗余序列、Blast 验证序列同源性后,共获得 150 条长度为 883 bp 的 D-loop 区序列用以下游分析。

150 条序列共检出 65 个变异位点,包括 18 个简约信息位点和 47 个单碱基变异位点;碱基平均含量为 T (29.3%)、C (20.6%)、A (33.8%) 和 G (16.2%),具有明显的(A+T)碱基偏倚。

由表 1 可知,多数群体具有较高的单倍型多样性(0.33~0.71),其中,GW 与 AQ 群体单倍型多样性最高(0.71),只有 QP 群体较低(0.33<0.5)。除 Hap 2、Hap 4、Hap 12 为多群体共享单倍型外,其余均为群体内独有单倍型,其中 MG 群体拥有最多的单倍型(9 个),QP 群体单倍型最少(2 个)。核苷酸多样性均较低(0.00311~0.00732<0.05),其中 MG 群体稍高(0.00732),QP 群体最低(0.00311),总体为高单倍型多样性、低核苷酸多样性。

由表 2 可知,5 个群体间发生了不同程度的分化(F_{ST} : -0.0116~0.4509),从轻微分化(F_{ST} <

表 1 5 个翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性参数

群体	变异位点 (S)	单倍型 (H)	单倍型多样性 (H_d)	核苷酸多样性 (P_i)
明光(MG)	38	9	0.64	0.00732
滁州(CZ)	28	4	0.59	0.00615
管湾(GW)	10	4	0.71	0.00434
秋浦(QP)	8	2	0.33	0.00311
安庆(AQ)	17	6	0.71	0.00536
总体	65	18	0.81	0.00599

0.05)到严重分化(0.25< F_{ST})不等。其中,QP 与 GW 群体分化程度最高,MG 与 CZ、AQ 与 CZ 群体分化程度最低(F_{ST} = -0.0116, -0.0014)。5 个群体间普遍产生了明显的基因交流(1< N_m),其中, MG 与 AQ 群体 N_m 值最高(N_m = 49.5),QP 与 GW 群体基因流不明显(N_m = 0.6089<1),而 AQ 与 CZ 群体、CZ 与 MG 群体 N_m 为负值。

表 2 5 个翘嘴鳊养殖群体的 F_{ST} (对角线下)与 N_m (对角线上)

群体	明光(MG)	滁州(CZ)	管湾(GW)	秋浦(QP)	安庆(AQ)
明光(MG)	—	-43.6034	2.3169	2.7051	49.5000
滁州(CZ)	-0.0116	—	3.2397	1.8148	-357.6430
管湾(GW)	0.1775	0.1337	—	0.6089	4.9764
秋浦(QP)	0.1560	0.2160	0.4509	—	1.7686
安庆(AQ)	0.0100	-0.0014	0.0913	0.2204	—

由表 3 可知,5 个群体的变异来源主要为群体内部变异(93.93%),少量来自群体间(6.07%)。

表 3 5 个翘嘴鳊养殖群体的 A-MOVA 分析

变异来源	自由度(df)	平方和	变异百分比 (%)
群体间	4	292.620	6.07
群体内	120	2873.520	93.93
总体	124	3166.144	100.00

2.2 群体结构分析

由图 2 可知,个体间遗传距离均不超过 0.05,且多数接近 0.00;除 GW 与 QP 群体的个体聚集外,其他群体间均有不同程度个体混合。由图 3 可知,单倍型网络图也显示出了相同的趋势,单倍型间并没有依据地理位置而聚集,而是通过 Hap 2、Hap 4 和 Hap 12,替换数个碱基后相连接,多数单倍型为群体内部独有。

3 讨论

遗传多样性是生物适应与进化的物质基础,丰富的遗传多样性使得物种能够更好地适应环境,拥有巨大的进化潜力。人工养殖的动物,常因亲本基数不足,产生奠基者效应,难以避免近交和遗传漂变,使得遗传多样性迅速丢失^[9]。本研究基于线粒体 D-loop 区序列分析了安徽省内 5 个翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性与结构。结果显示,150 条 D-loop 序列共检出 18 个单倍型,65 个变异位点,其中,包括 18 个简约信息位点与 47 个单碱基突变位点。D-loop 区碱基组成呈现明显的(A+T, 63.1%)碱基偏倚,符合脊椎动物线粒体碱基构成的一般特征^[10]。5 个群体的遗传多样性指数表现为较高的单倍型多样性($H_{d,mean}$ = 0.596)与较低的核苷酸多样性($P_{i,mean}$ = 0.0053)的模式。与野生鳊相比,养殖群体的单倍型多样性与核苷酸多样性都有较多的流失。比如,程起群等同样使用线粒体

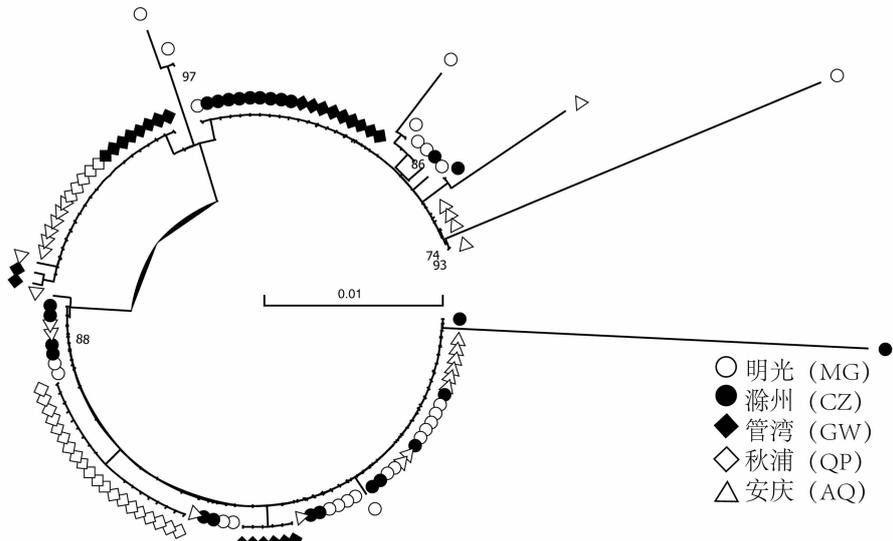


图2 5个翘嘴鲈养殖群体的邻接法系统发育树

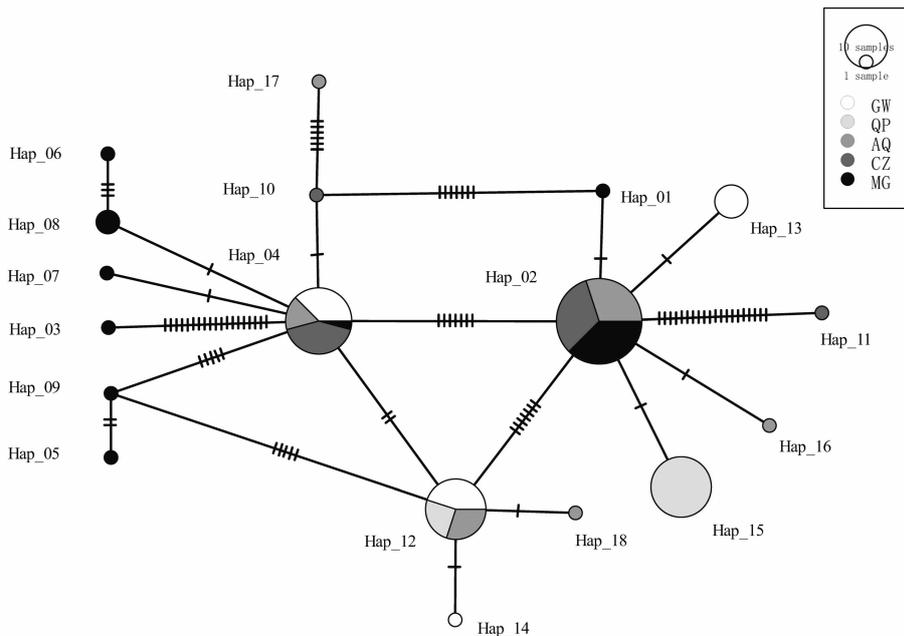


图3 5个翘嘴鲈养殖群体的单倍型网络

D-loop 区作为分子标记,对长江流域的大眼鲈 (*Siniperca nerii*) 进行了遗传多样性调查,结果显示, $H_{d,mean} = 0.923$, $P_{i,mean} = 0.0095$ ^[11]; 成为为等使用微卫星标记,对3个野生翘嘴鲈群体和2个养殖群体进行了遗传多样性调查,结果同样表明野生群体的遗传多样性要高于养殖群体^[12]。此外,这种模式暗示5个群体近期可能经历瓶颈事件,产生奠基者效应,使得核苷酸多样性在小群体中经由遗传漂变迅速丢失^[13]。这一模式在其他物种的养殖群体中也有所报道,苏雨等基于 D-loop 区分析了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 养殖群体的遗传多样

性,结果显示, $H_{d,mean} = 0.931$, $P_{i,mean} = 0.0143$; 赵立祥等同样采用 D-loop 区作为标记,分析了宝石鲈 (*Scortum barcoo*) 养殖群体的遗传多样性,结果显示 $H_{d,mean} = 0.274$, $P_{i,mean} = 0.0008$ 。

遗传多样性的时空差异分布,造成了不同的群体结构,对于群体结构的了解,有助于更好地制定养殖模式与育种策略。遗传分化指数 F_{ST} 是用来衡量群体分化程度的一个指标,根据 Wright 的划分标准可分为: 0.00~0.05, 无分化; >0.05~0.15, 中度分化; >0.15~0.25, 高度分化; >0.25, 重度分化^[14]。由表2和图2可知,本研究的遗传分化系数

分析结果发现,多数群体间都发生了高度分化($F_{ST\ mean} = 0.144$),但是个体间遗传距离却均 <0.05 ,并且多数接近 0。一般认为遗传距离超过 0.01 时,就表明群体遗传变异较大^[15]。由表 1 可知,遗传距离与遗传分化指数间的矛盾,可用群体间单倍型多样性与核苷酸多样性的差异解释,这是因为遗传距离是以核苷酸差异为计算基础,而遗传分化指数是以基因型频率为计算基础。更进一步,产生这一矛盾的根本原因可能是由于奠基者效应使得核苷酸多样性迅速丢失,而单倍型多样性的保留在不同群体间产生了差异。同样地,在单倍型网络图显示出了和系统进化树相似的结果,5 个群体的单倍型并没有依照地理位置聚集,反而以 3 个主要共享单倍型 Hap 2、Hap 4、Hap 12 为中心,其余单倍型通过数个碱基的替换演变成群体内部独有单倍型。A-MOVA 分析显示,5 个群体间的变异来源主要是群体内部(93.93%),少数来自群体间(6.07%)。

综上所述,本研究基于能够反映种群间遗传多样性的线粒体 D-loop 区为分子标记,分析了 5 个安徽省翘嘴鳊养殖群体的遗传多样性与群体结构。结果表明,5 个群体的遗传多样性较低,可能发生过瓶颈事件;群体结构发生了中等程度的分化,产生了各个群体内部独有的单倍型,但是群体间遗传距离较小,不足以认定为群体间有差异。因此,在后续的繁殖与选育工作中,应当加强对遗传背景的筛查,避免因遗传背景的相似,使得育种工作得不到有效实施。

参考文献:

- [1] 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.
[2] 曾庆凯,孙成飞,董凌键,等. 翘嘴鳊 3 个不同群体的遗传多样性

- 分析[J]. 基因组学与应用生物学,2017,36(8):3241-3250.
[3] 颜元杰,曹哲明,丁炜东,等. 江苏省 6 个翘嘴鳊群体的遗传多样性分析[J]. 海洋渔业,2019,41(1):25-33.
[4] Taanman J W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1999,1410(2):103-123.
[5] Galtier N, Nabholz B, Glémin S, et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal[J]. Molecular Ecology, 2009,18(22):4541-4550.
[6] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution,2018,35(6):1547-1549.
[7] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25 (11): 1451-1452.
[8] Leigh J W, Bryant D. Popart: full - feature software for haplotype network construction[J]. Methods in Ecology and Evolution,2015,6(9):1110-1116.
[9] Ventura M, Petrusek A, Miró A, et al. Local and regional founder effects in lake zooplankton persist after thousands of years despite high dispersal potential [J]. Molecular Ecology, 2014, 23 (5): 1014-1027.
[10] Satoh T P, Miya M, Mabuchi K, et al. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes [J]. BMC Genomics, 2016, 17 (1):719.
[11] 程起群,吕浩,逢娇慧,等. 长江流域 4 个野生大眼鳊群体的遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2019,26(4):774-782.
[12] 成为为,夏儒龙,王青云,等. 不同野生群体与家系养殖翘嘴鳊遗传多样性分析[J]. 淡水渔业,2020,50(2):31-37.
[13] Grant, W, Bowen, et al. 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.
[14] Wright S. Evolution in mendelian populations [J]. Bulletin of Mathematical Biology,1990,52(1/2):241-295.
[15] Lan H, Shi L. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: an approach from mitochondrial DNA polymorphism [J]. Biochemical Genetics,1993,31(1/2):51-60.