

利用线粒体序列分析野生唇鲮群体的遗传结构

佟广香, 匡友谊, 徐伟*

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:运用 PCR 直接测序法,对 8 个野生唇鲮群体线粒体 *ATP6* 和 *ND4* 基因部分序列进行测定,共获得 1 629 bp 序列,序列变异率为 4.97%,核酸多样性为 0.007 5,表明野生唇鲮群体保持了较好的遗传多样性;在 8 个野生唇鲮群体中共检测出 21 个单倍型,其中 HQ1 和 HT2 单倍型共包含了 45.24%的个体,且单倍型网络图均以 HQ1 和 HT2 向四周发散,说明 HQ1 和 HT2 为祖先单倍型,其他群体再演化过程中形成特有的单倍型;AMOVA、群体间遗传分化系数及遗传距离分析显示不同水系群体的遗传分化达到了显著水平;单倍型聚类图显示乌苏里江和黑龙江流域地理群体大部分单倍型能够聚在一起,鸭绿江流域地理群体聚为 1 支,长江流域和黑龙江嘉荫群体聚为 1 支。

关键词:唇鲮; *ATP6*; *ND4*; 遗传结构

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)06-0654-05

Genetic structure of wild *Hemibarbus labeo* populations inferred from mtDNA sequence

TONG Guang-xiang, KUANG You-yi, XU Wei*

(Heilongjiang River Fishers Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Partial sequences of mitochondrial *ATP6* and *ND4* gene were determined by PCR direct sequencing from 8 wild *Hemibarbus labeo* populations. The length of the amplified fragments of the two genes was 1 629 bp in total, with mutation rate of 4.97% and nucleotide diversity of 0.007 5. The results indicated that the wild *Hemibarbus labeo* populations maintained a high genetic diversity. Twenty one haplotypes were detected from 8 populations among which 45.24% of the individuals belong to HQ1 and HT2 haplotypes. Network of haplotypes showed that HQ1 and HT2 were centered by other haplotypes, which indicated that HQ1 and HT2 were the ancestor haplotypes and other specific haplotypes were formed during the evolution. AMOVA, *FST* and genetic distance analysis indicated that the difference of 8 populations from different river systems reached a significant level. Phylogenetic tree based on haplotypes revealed that most of the *Hemibarbus labeo* populations from Wusulijiang River and Heilongjiang River clustered together, and the populations from Yalujiang River clustered alone while populations from Yangtze River and Jiayin region of Heilongjiang River clustered together.

Key words: *Hemibarbus labeo*; *ATP6*; *ND4*; genetic structure

唇鲮(*Hemibarbus labeo*)属鲤科, 鮡亚科, 鲮属, 是典型的江河底栖中小型鱼类, 其含肉率较高, 味道鲜美, 尤其是唇部的肉质极佳, 具有较高的经济

价值, 是黑龙江水系重要的经济鱼类之一^[1]。近 10 年来, 环境污染和过度捕捞等因素导致其数量急剧下降^[2]。为保护和开发这一经济鱼类, 目前唇鲮的人

收稿日期: 2011-10-10

基金项目: 农业科技成果转化基金项目(SQ2011EC3260080); 黑龙江省科技攻关计划项目(GC05B509)

作者简介: 佟广香(1978—), 女, 江苏省沛县人, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种和种质资源研究, tong2200@163.com; *通信作者, xwsc23@tom.com

工繁殖和驯化养殖已获得成功^[3], 但关于其群体遗传背景和演化方面的研究较少^[4-5]。鱼类线粒体 DNA 具有分子小、结构简单、进化快等特点, 已成为鱼类进化遗传学、分子生态学、遗传多样性及其保护生物学等研究的重要标记^[6]。鱼类线粒体 DNA 不同区域的进化速率不同, 线粒体各基因的系统发育信息表现也有所不同。为探明野生唇鲮群体的遗传多样性, 选择进化较快的基因 *ND4* 和进化较慢的基因 *ATP6*^[7], 对唇鲮 8 个地理群体进行分析, 旨在为野生唇鲮的保护和持续利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品共 42 个(表 1), 来自同一水系的群体设定为一组, 其中, 来自牡丹江和鸭绿江的样品为鳍条, 保存于 75%乙醇中, 来自其他群体的样品为唇鲮肌肉, 冷冻保存。

表 1 供试唇鲮群体的基本情况

来自水系	代号	样本数/个	采集地
乌苏里江	HT	6	乌苏里江虎头江段
	HQ	6	乌苏里江海青江段
	ZJ	6	乌苏里江抓吉江段
长江	SC	6	长江水系涪江成都江段
黑龙江	XK	6	黑龙江逊克江段
	JY	6	黑龙江嘉荫江段
鸭绿江	YL	4	鸭绿江临江江段
牡丹江	MR	2	牡丹江镜泊湖

1.2 PCR 扩增及序列测定

采用酚-氯仿法提取样品 DNA。用 1.0%琼脂糖凝胶对提取的 DNA 进行电泳检测, 并用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 用 0.1×TE 将样品质量浓度调整为 100 ng/μL, 备用。

PCR 反应体系 25 μL, 其中, DNA 1 μL, *Taq* 酶(MBI 5 U/μL)0.2 μL、MgCl₂(2 mmol/L)2.5 μL、dNTP(2 mmol/L)2 μL 和 10×PCR 混合 buffer 2.5 μL, 10 pmol/L 的上下游引物各 1 μL。ATP6 引物为: L8331(AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC);

H9236(GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC)^[8]。*ND4* 引物为: L119582*ND4*(GGAGGCTACGGCA TAATACGAA); H127802 Leu(GGTTCCCTAAGAC CAACGGATG)^[9]。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物纯化后送上海生工生物工程技术有限公司测序, 用 Base-Call 算法对获得的测序峰进行碱基判读, 用 GAP4 进行序列拼接, 去除 5'和 3'端平均置信度低于 15 的低分值碱基。

1.3 数据分析

用 ClustalW 软件对所获的序列进行多重比对, 用 BioEdit 软件检查比对结果并手动校正。用 PAUP4.10b 软件分析碱基的转换率和颠换率。用 ModelTest3.0 软件确定核苷酸最佳进化模型, 并在此基础上用最大简约法和最大似然率构建系统发生树(Bootstrap 值为 1 000)。采用 Mega4.0 软件的 Kimura 双参数模型, 计算 8 个群体的群体内、群体间及单倍型间的遗传距离。用 TCS1.13 软件构建单倍型的无根进化网络。用 Arlequin3.1 软件计算单倍型多态性和核苷酸多态性, 进行 AVOMA 分析, 以确定群体间遗传分化系数。

2 结果与分析

2.1 基因序列

ATP6 基因序列片段长度为 880 bp, 共有 39 个变异位点, 变异率为 4.43%, 碱基转换率与颠换率之比为 4.53。*ND4* 基因序列片段长度为 749 bp, 共有 42 个变异位点, 变异率为 5.61%, 碱基转换率与颠换率之比为 5.29。2 个基因数据合并后共有 1 629 bp, 有 81 个变异位点, 变异率为 4.97%, 最佳进化模型为 TrN + I, 最佳模型下的核酸组成为 A 28.9%、T 28.1%、G 15.3%和 C 27.7%, 碱基转换率与颠换率之比为 6.55。单倍型多样性指数、核酸多样性指数见表 2。

表 2 *ATP6* 和 *ND4* 基因在唇鲮群体中的单倍型多样性和核苷酸多样性指数
Table 2 Haplotype and nucleotide diversity of *ATP6* and *ND4* among *Hemibarbus labeo* populations

群体	单倍型多样性指数			核苷酸多样性指数		
	<i>ATP6</i>	<i>ND4</i>	<i>ATP6</i> 与 <i>ND4</i> 合并	<i>ATP6</i>	<i>ND4</i>	<i>ATP6</i> 与 <i>ND4</i> 合并
HT	0.600 0	0.533 3	0.600 0	0.009 6	0.009 3	0.009 5
HQ	0.333 3	0.333 3	0.333 3	0.005 7	0.005 8	0.005 7
ZJ	0.800 0	0.533 3	0.800 0	0.009 2	0.009 3	0.009 2
SC	0.733 3	0.333 3	0.733 3	0.008 9	0.008 9	0.008 9
XK	0.600 0	0.333 3	0.600 0	0.006 1	0.005 8	0.005 9
JY	0.933 3	0.933 3	1.000 0	0.012 7	0.014 7	0.013 6
YL	0.900 0	1.000 0	1.000 0	0.004 1	0.010 9	0.007 2
MR	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0
所有群体	0.612 5	0.500 0	0.633 3	0.007 1	0.008 1	0.007 5

2.2 单倍型网络

ATP6 与 *ND4* 的合并结果表明：共检测到 21 个单倍型 42 个个体(表 3)，其中，单倍型 HQ1 和 HT2 共包含了 19 个个体，占总数的 45.24%；单倍型 SC1 和 SC3 共包含了 6 个个体，占总数的 14.29%；

其余单倍型均仅包含 1 个个体。*ATP6* 和 *ND4* 及其合并后的单倍型网络(图 1，封三)均以 HQ1 和 HT2 为中心，向四周发散，其中 SC 群体演化步骤最多，说明 HQ1 和 HT2 为祖先单倍型，其他群体是祖先群体向不同方向演化产生的。

表 3 *ATP6* 和 *ND4* 合并后的单倍型在唇鲮群体中的分布

Table 3 Haplotypes and their frequencies observed in all populations based on combined data of *ATP6* and *ND4*

群体	单倍型个体数/个																					
	HQ1	HQ4	HT1	HT2	HT6	ZJ2	ZJ5	XK1	XK6	JY2	JY3	JY4	JY5	JY6	YL1	YL2	YL3	YL4	SC1	SC3	SC4	
HQ	5	1																				
HT			1	4	1																	
ZJ	3			1		1	1															
XK				4				1	1													
JY										1	1	1	1	1							1	
MR	2																					
YL															1	1	1	1				
SC																			3	2	1	

2.3 遗传分化

由表 4 可知，HQ 和 MR 的群体间遗传距离(0.003)最小，HQ 和 SC 的群体间遗传距离(0.023)最大。根据分化年代=遗传距离/(2×进化率)^[10]，以鲤科鱼类进化率 3.3×10^{-8} 进行计算，野生唇鲮群体间的分化时间为 $(4.55 \sim 34.80) \times 10^4$ 年。由表 5 可知地理群体间差异不显著，群体间和不同水系间差异达到显著水平，说明地理群体间已经产生了分

表 4 *ATP6* 和 *ND4* 合并后群体间的遗传距离

Table 4 Genetic distance among *Hemibarbus labeo* populations based on combined data of *ATP6* and *ND4*

群体	遗传距离						
	HT	HQ	SC	XK	JY	ZJ	YL
HQ	0.011						
SC	0.022	0.023					
XK	0.007	0.012	0.021				
JY	0.019	0.020	0.010	0.018			
ZJ	0.010	0.007	0.023	0.011	0.020		
YL	0.012	0.017	0.023	0.010	0.020	0.015	
MR	0.012	0.003	0.023	0.014	0.021	0.006	0.019

化。遗传分化系数(表 6)表明, JY 群体和 SC 群体间无分化, 二者与其他群体间差异显著; YL 群体间遗传分化不显著。用最大简约法和最大似然率与 MR 群体间遗传分化不显著, 与其他群体间差异均达到显著水平; ZJ、HQ、HT、XK 和 MR 群构建的系统发生树一致, 乌苏里江和黑龙江流域地理群体大部分单倍型能够聚在一起, 鸭绿江流域地理群体聚为一支, 长江流域和黑龙江嘉荫群体聚为一支(图 2)。

表 5 8 个群体的 *ATP6*、*ND4* 及其合并后分子的方差分析
Table 5 AMOVA based on respective and combined data of *ATP6* and *ND4* in 8 *Hemibarbus labeo* populations

基因	方差来源	平方和	方差分量	总变异率/%
<i>ATP6</i>	组间	93.188	1.822 64	27.92*
	组内群体间	32.333	1.214 39	18.60*
	群体内	122.200	3.491 43	53.48
<i>ND4</i>	组间	91.353	1.722 73	26.42*
	组内群体间	36.611	1.481 25	22.72*
	群体内	112.750	3.316 18	50.86
<i>ATP6</i> 和 <i>ND4</i> 合并后	组间	182.817	3.590 19	27.34*
	组内群体间	68.944	2.688 09	20.47*
	群体内	233.000	6.852 94	52.19

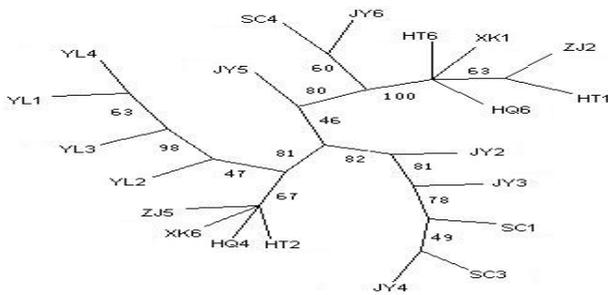
“*” 示差异显著。

表 6 *ATP6* 和 *ND4* 合并后唇鲮群体间的遗传分化系数

Table 6 *FST* of combined gene sequence of *ATP6* and *ND4* among *Hemibarbus labeo* populations

群体	群体间遗传分化系数						
	ZJ	HT	HQ	JY	XK	YL	MR
HT	0.034 51						
HQ	-0.109 09	0.277 27					
JY	0.416 70*	0.377 94*	0.518 17*				
XK	0.279 61	-0.105 88	0.525 00	0.452 67*			
YL	0.443 11*	0.280 51*	0.621 69*	0.445 39*	0.356 08*		
MR	-0.098 87	0.378 20	-0.304 35	0.494 31*	0.666 79	0.716 31	
SC	0.592 04*	0.573 06*	0.675 77*	-0.103 84	0.646 14*	0.646 14*	0.692 24*

“*” 示差异显著。



聚类树分支上的数据表示 Bootstrap 支持率(%)。

图 2 *ATP6* 和 *ND4* 合并后构建的单倍型最大似然聚类树
Fig.2 ML tree of haplotypes of the combined *ATP6* and *ND4* sequences

3 结论与讨论

单倍型多态性、核酸多态性、单倍型网络及分子方差分析结果表明, *ND4* 和 *ATP6* 的差别不大, 因此可以将 2 个数据合并进行分析。合并后序列共有 1 629 bp, 在最佳模型下, A+T 含量为 57.0%, G+C 含量为 43.0%, A+T 的含量明显高于 G+C 的含量, 同时还表现出很强的碱基组成偏向性, 即在碱基 A、T、G、C 中, G 的含量明显低于其他 3 种碱基的含量。这与脊椎动物线粒体 DNA 的特点一

致^[11]。碱基转换率与颠换率之比为 6.55, 这也与线粒体基因组 DNA 进化过程中碱基转换发生频率远远高于碱基颠换发生频率的规律相符。

遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化能力提供了潜在的遗传基础和储备^[12]。核酸多样性指数是衡量物种或群体遗传多样性的重要指标。本研究中唇鲮基因 *ATP6*、*ND4* 合并后的核酸多样性指数为 0.007 5, 与鲤科其他鱼类^[13-15]相比, 其遗传多样性水平属于中等, 与用微卫星^[4]及用 RAPD^[5]分析得出的研究结果相似, 表明目前唇鲮种质资源的遗传多样性较为丰富。近几十年来, 唇鲮资源量急剧下降^[16], 因此, 不能因为目前相对丰富的遗传多样性水平而忽视对唇鲮资源必要的保护与管理。

本研究结果表明, HQ1 和 HT2 单倍型为唇鲮的祖先单倍型; HQ、HT、ZJ、XK 和 MR 群体中 2/3 以上的个体均属于 HQ1 和 HT2 单倍型, 由此可知, 乌苏里江水系和黑龙江水系是唇鲮的发源地, 其他群体是由这些群体迁徙演化形成的, 或者是由地质灾害、人为因素等导致各地理群之间产生隔

离,从而向不同方向演化的结果。在演化过程中不同群体形成了特有的单倍型。资源调查^[2]也显示,早在20世纪五六十年代,唇鲮分布的水域较广,在黑龙江和嫩江上游分布较多,其次分布在松花江、乌苏里江、牡丹江、达赉湖、镜泊湖和五大连池等水域,目前只在黑龙江、乌苏里江还有分布,在其他河流已很难见到。究其原因,首先是因为黑龙江和乌苏里江具有地理优势。这2条河是中国和俄罗斯的界河,地理位置较为偏远,居住人口较少,自然水域受到人为的影响较小,因此,保护相对较好。其次是针对黑龙江和乌苏里江的捕鱼政策较好,对网目和鱼具有严格的限制,并将鱼类繁殖季节定为禁鱼期,加上俄罗斯境内很少有渔船作业,因此,良好的生存环境使唇鲮祖先单倍型得到了保护。

AMOVA分析显示,唇鲮组间和组内群体间差异显著,群体内差异不显著;群体间遗传分化系数表明JY与SC群体间无分化,JY、SC和YL群体间及这3个群体与其他大部分群体间的差异均达显著水平;遗传距离分析显示SC和JY群体间遗传距离较小,SC、JY及YL与其他群体间的遗传距离较大;最大似然聚类树结果显示SC和JY大部分单倍型聚为一支,YL单倍型聚为一支,其他单倍型聚为2支,可见,地理隔离已经使群体产生分化,且普遍有地理距离越大遗传分化就越大的趋势。

参考文献:

- [1] 孟庆闻, 缪学祖, 俞泰济, 等. 鱼类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 233-235.
- [2] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 137-140.
- [3] 徐伟, 李池陶, 耿龙武, 等. 乌苏里江唇鲮的全人工繁殖[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 550-556.
- [4] 胡雪松, 石连玉, 李池陶, 等. 黑龙江和乌苏里江唇鲮的微卫星引物筛选及群体遗传结构[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 230-236.
- [5] 吕耀平, 胡则辉, 叶丽平, 等. 瓯江流域唇鲮和花鲮线粒体COII基因部分序列分析[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2008, 35(5): 580-585.
- [6] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体DNA研究新进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983-1000.
- [7] 陈姝君, 赫崇波, 木云雷, 等. 硬骨鱼类线粒体基因系统发育信息效率分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 12-21.
- [8] Brice Quenouille, Eldredge Bermingham, Serge Planes. Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 31(1): 66-68.
- [9] 丁言伟, 彭作刚, 张训蒲, 等. 黄颡鱼属两种鱼类的线粒体ND4基因序列变异性分析[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 413-419.
- [10] 董金苟, 吴清江. 三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 54-60.
- [11] Meyer A. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes [M]. London: Elsevier Science Publishers, 1993: 1-38.
- [12] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999: 130-136.
- [13] 李思发, 吕国庆, 贝纳切兹. 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.
- [14] 袁希平, 严莉, 徐树英, 等. 长江流域铜鱼和圆口铜鱼的遗传多样性[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 377-385.
- [15] 彭珊, 代应贵. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群mtDNA D-loop序列多态性[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 196-200.
- [16] 徐伟, 李池陶, 曹顶臣, 等. 乌苏里江唇鲮的鳞片和生长特征[J]. 动物学杂志, 2008, 43(3): 108-112.

责任编辑: 王赛群