

广东与江西翘嘴鳊养殖与天然种群的遗传多态性分析

杨宇晖¹, 梁旭方^{1*}, 林群¹, 李锦光¹, 王琳¹, 谢骏²

(1. 暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要:对翘嘴鳊4个人工繁殖群体[江西南昌国家级翘嘴鳊原种场(1个群体)、广东南海人工繁殖群体(2个群体)、广东惠州人工繁殖群体(1个群体)]及2个天然群体(江西鄱阳湖养1个月;江西鄱阳湖养2~3 d)共60尾的线粒体控制区(D-loop)核苷酸序列进行扩增后测序和遗传多态性分析。采用特异性引物对翘嘴鳊基因组进行PCR扩增,得到翘嘴鳊线粒体DNA控制区基因的全序列(833 bp)。分析得到的D-loop区碱基序列中60个个体共检测到65个变异位点,其中43个是单一变异位点,22个为简约信息位点。60个个体共检测出22个单倍型。分析结果表明,江西两个天然群体基因交流充分,未出现遗传分化,但相对江西省翘嘴鳊原种,广东省翘嘴鳊养殖种群多态性偏低。因此,广东省从其他省鳊鱼原种场引进翘嘴鳊原种是非常有必要的,这对我国集约化主产区广东省的鳊鱼产业向高效、优质的方向持续健康发展具有重要意义。

关键词:翘嘴鳊; 线粒体DNA; 控制区; 遗传多态性

中图分类号:Q 346; S 917

文献标识码:A

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)俗称季花、桂花,隶属鲈形目(Perciformes)、暖鲈科(Percichthyidae)、鳊属,是鳊属鱼类中体型最大、生长最快的一种鳊鱼。其肉质坚实细嫩、味道鲜美、营养丰富、无肌间刺,是一种经济价值很高的名贵品种,在我国淡水养殖业中占重要经济地位。随着鳊鱼养殖业的发展,其养殖规模不断扩大,养殖密度不断提高,水域生态环境不断遭到人为破坏,加之饲养管理不善,导致鳊鱼疾病呈暴发流行之势^[1],近年来翘嘴鳊资源显著减少,在有些地方甚至成为偶见种^[2]。因此,研究开发和保护翘嘴鳊资源越显重要和迫切,开展翘嘴鳊的分子生物学研究,以揭示翘嘴鳊的遗传特征,为渔业利用提供相关资料以及翘嘴鳊的人工养殖及资源保护提供科学依据。

线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)呈环形结构,典型的母系遗传、较高的突变性、几乎

无重组等特点^[3]已经成为群体遗传学和分子系统学研究的热点。在mtDNA中,D-loop区为非编码区,由于其不编码蛋白质而不受自然选择的,受进化压力小,比线粒体基因组其他区域进化速率快,是多态性最多的片段^[4]。目前国内虽已有关于翘嘴鳊的遗传特性和遗传多样性研究,但还不够深入^[5-8]。本研究采用PCR产物直接测序的方法^[9-14],通过测定来自江西广东两省的6个群体翘嘴鳊线粒体D-loop区的全序列,研究分析天然群体和人工繁殖群体的遗传多态性,为种质资源研究、人工养殖及品种培育提供相关的遗传背景资料 and 理论依据,为分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼 翘嘴鳊6个群体分别采于江西南

收稿日期:2009-07-25 修回日期:2009-08-29

资助项目:广东省海洋渔业科技推广专项项目(A200899D02);广东省自然科学基金项目(031806, 980702);广东省科技兴海(渔)项目(B200701A06);广州市番禺区科技计划项目

通讯作者:梁旭方, Tel:020-85221497; E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

昌国家级翘嘴鳊原种场(1个群体,2008年12月取样)、鄱阳湖(同一捕捞群体的2个取样样本:暂养2~3 d,暂养1个月,2008年11月取样)、广东惠州当地养殖(1个群体,2008年10月取样)、广东南海当地养殖(2个群体,2007年4月和2008年11月取样),每个群体各10尾,共60尾。

实验试剂 TIANGEN DNA提取试剂盒为合达公司(广州)产品, *Taq*TM DNA聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品,其它试剂均为进口分装或者国产分析纯试剂。

1.2 方法

基因组DNA提取 分离各组鱼的鳍条组织,总DNA的提取与纯化按TIANGEN DNA提取试剂盒推荐方法进行。

翘嘴鳊线粒体DNA控制区序列的测定 根据已知动物线粒体DNA核苷酸序列的保守区域设计合成1对特异引物, CON01F: 5'-ACCCCTGGCTCCCAAAGC-3', CON02R: 5'-ATCTTAGCATCTTCAGTG-3'。以翘嘴鳊DNA为模板,用CON01F和CON02R为引物进行PCR扩增,PCR反应体系:PCR反应总体积为50 μ L,其中10 \times Buffer缓冲液5 μ L, dNTP 4 μ L, *Taq* 酶0.25 μ L, CON01F和CON02R均为1 μ L,模板2 μ L,最后补充灭菌双蒸(ddH₂O)水至50 μ L。CON01F和CON02R引物扩增条件为94 $^{\circ}$ C下预

变性3 min,94 $^{\circ}$ C下变性1 min,50 $^{\circ}$ C下退火45 s,72 $^{\circ}$ C下延伸1 min,共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C下延伸5 min。

PCR产物的克隆及序列分析 PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后,由英骏公司进行测序。测得的序列用Clustal X 1.81程序^[15]进行比对,并辅以人工校对。利用DnaSP 4.0^[16]软件计算各群体的单倍型多样性(H)、样本中所有单倍型对两两的平均核苷酸差异数(K)、核苷酸多态性(P_i);统计翘嘴鳊各天然群体间的遗传分化指数(F_{ST}),并根据 $N_m \approx (1 - F_{ST}) / (2F_{ST})$ 得到群体间的基因流值(N_m)。应用MEGA 4.0软件包分析序列特征、统计碱基组成和转换与颠换值、计算遗传差异和遗传距离。

2 结果

2.1 mtDNA控制区序列长度及碱基组成

翘嘴鳊mtDNA D-loop序列长度为830~834 bp,序列碱基组成见表1,6个群体的碱基组成基本一致,T,C,A,G 4碱基含量分别为30.4%,20.4%,33.7%和15.5%,没有显著变化。碱基G的含量显著低于其他碱基的含量,A+T(平均为64.1%)明显高于C+G(平均为35.9%)的含量。转换与颠换比(TS/TV)为2.5。

表1 翘嘴鳊序列碱基组成

Tab.1 Nucleotide compositions of mtDNA control region in *Siniperca chuatsi*

群体 population	T	C	A	G	%
鄱阳湖养1个月(Poyang lake 1)	30.5	20.5	33.7	15.4	
鄱阳湖养2~3 d(Poyang lake 2)	30.5	20.3	33.8	15.4	
南昌(Nanchang)	30.3	20.4	33.7	15.4	
南海1(Nanhai 1)	30.4	20.4	33.7	15.5	
南海2(Nanhai 2)	30.5	20.4	33.5	15.5	
惠州(Huizhou)	30.4	20.3	33.7	15.5	
平均 average	30.4	20.4	33.7	15.5	

2.2 翘嘴鳊群体多态位点分析

6个群体多态位点分析结果(图1)表明:60个个体共检测到65个变异位点,其中43个是单一变异位点,22个为简约信息位点。60个个体共检测出22个单倍型。

2.3 群体遗传多态性参数统计

利用DnaSP 4.0软件计算各群体的单倍型多

样度(H)、样本中所有单倍型对两两的平均核苷酸差异数(K)、核苷酸多态性(P_i),从统计结果(表2)可知,江西省3个群体的 H 值均较高。而从衡量群体遗传水平的 K 值和 P_i 值来看,2个天然群体(江西鄱阳湖养2~3 d和南昌)明显高于其他群体。

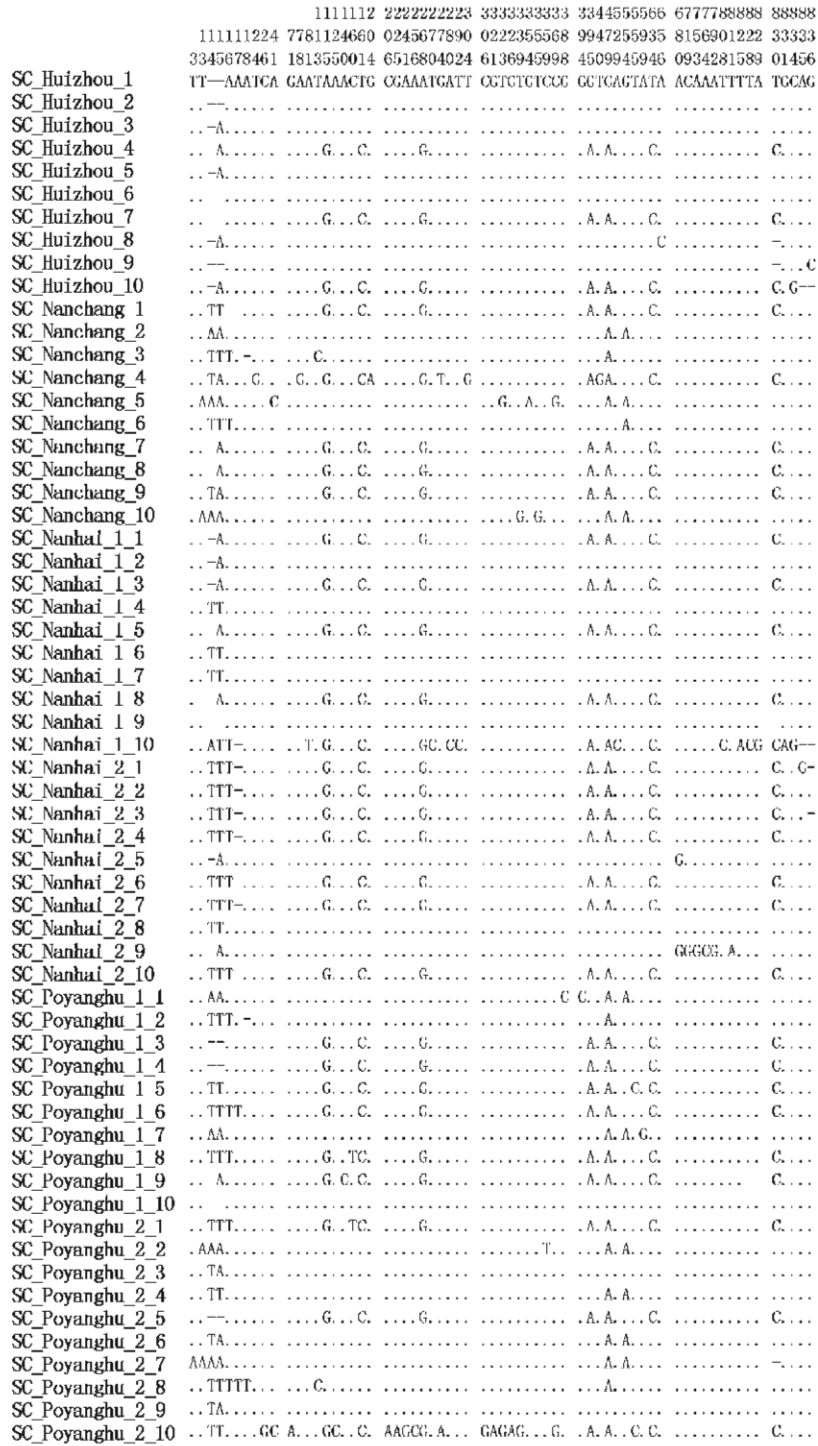


图1 翘嘴鲌 D-loop 全序列变异情况

(Huizhou:惠州, Nanchang:南昌, Poyanghu:鄱阳湖, Nanhai:南海,后面为样品编号)图上数字由上至下为碱基变异位点在所测序列中的位置;圆点(.)表示与 SC-huizhou1 有相同的碱基组成;横线(-)表示碱基缺失。

Fig. 1 Variations of mtDNA control region in *Siniperca chuatsi*

The numerals at the top indicate the location of the variable sites in the sequence analysis. A dot (.) indicates identity with SC-huizhou1 sequence. Hyphens (-) indicate gaps.

表 2 翘嘴鲌 6 个群体统计参数

Tab. 2 Demographic parameters estimated from six *Siniperca chuatsi* populations

群体 populations	单倍型多样性 H	平均核苷酸差异数 K	核苷酸多态性 P_i
鄱阳湖养 1 个月 Poyang lake 1	0.978	5.689	0.006 88
鄱阳湖养 2~3 d Poyang lake 2	0.978	9.333	0.011 26
南昌 Nanchang	0.933	7.956	0.009 57
南海 1 Nanhai 1	0.644	5.133	0.006 20
南海 2 Nanhai 2	0.667	5.644	0.006 80
惠州 Huizhou	0.644	3.200	0.003 86
平均 average	0.807	6.159	0.007 43

2.4 群体遗传距离的计算

群体间的序列差异反映的是生物间亲缘关系的远近,使用 MAGA 4.0 软件中 Tamura-Nei 模型计算群体内及群体间的遗传距离(表 3)。结果表

明,广东惠州和广东南海人工养殖群体间的亲缘关系较近,而江西鄱阳湖养 2~3 d 天然群体与其他群体间的亲缘关系较远。

表 3 翘嘴鲌 6 个群体的遗传距离

Tab. 3 Genetic distance of six different populations

	鄱阳湖养 1 个月 Poyang lake 1	鄱阳湖养 2~3 d Poyang lake 2	南昌 Nanchang	南海 1 Nanhai1	南海 2 Nanhai2	%
鄱阳湖养 1 个月 (Poyang lake 1)						
鄱阳湖养 2~3 d (Poyang lake 2)	0.7					
南昌 (Nanchang)	0.6	0.8				
南海 1 (Nanhai1)	0.6	0.8	0.7			
南海 2 (Nanhai2)	0.5	0.8	0.6	0.6		
惠州 (Huizhou)	0.5	0.7	0.6	0.5	0.5	

2.5 天然群体间遗传分化指数

DnaSP 4.0 软件统计各天然群体间的遗传分化指数和基因流(表 4)。

3 讨论

群体遗传学研究认为,引起群体分化另外一个重要的原因是遗传漂变和自然选择的作用^[17]。Wright^[18]认为群体间基因流大于 1,则能发挥均质化作用,即能有效抑制由遗传漂变而引起的遗传分化反之,如果群体间基因流小于 1,则不能有效抑制由遗传漂变而引起的遗传分化,表明基因

流成了遗传分化的主要原因。本研究表明 2 个天然群体之间,鄱阳湖 1 和鄱阳湖 2 组的 N_m 值达到 22.145,远远大于 1,可见其从同一湖泊中的群体基因交流比较充分。从而抵制了由遗传漂变导致的群体间遗传分化。不同群体间的遗传距离反映了其分化状况的程度,而一个群体内的遗传距离反映了该群体的遗传多样性^[19]。从上述遗传距离的结果来看,广东惠州和广东南海人工养殖群体间的亲缘关系较近,而江西鄱阳湖两组天然群体与其他群体间的遗传距离都比较大,说明亲缘关系较远。

表 4 各天然群体间遗传分化指数和基因流

Tab. 4 Genetic differentiation among nature populations

群体 1 population 1	群体 2 population 2	遗传分化指数 F_{ST}	基因流 N_m
鄱阳湖养 1 个月 Poyang lake 1	鄱阳湖养 2~3 d Poyang lake 2	0.022 08	22.145

生物群体遗传多样性是物种适应多变的环境、维持长期生存和进化的遗传基础,是评价生物资源状况的一个重要依据。核苷酸多态性(P_i)作为衡量一个群体间遗传多态性的重要指标,表示各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例。从翘嘴鳊 6 个群体各自的 P_i 值分别来看,江西省翘嘴鳊天然群体核苷酸多态性水平(P_i)均高于广东省人工繁殖群体遗传多样性。从翘嘴鳊 6 个群体各自的 P_i 值分别来看,惠州 2008 年 10 月人工繁殖采样群体、南海人工繁殖采样群体核酸多态性均较低,而鄱阳湖养 2~3 d 天然群体明显高于其余者,其次为江西南昌国家级翘嘴鳊原种场群体,鄱阳湖养 1 个月天然群体也高于广东省人工繁殖群体。

从本研究的翘嘴鳊群体总体来看,其群体 mtDNA 多态性较丰富,60 个样品就检测到单倍型 22 种。但 P_i 值却普遍不高,其中江西鄱阳湖养 2~3 d 天然群体为 0.011 26 为最高。而高 H 值、低 P_i 值表明翘嘴鳊这个群体可能是由一个较小的有效群体迅速增长,尽管变异导致单倍型的多态性的积累,但核苷酸序列的多样化还未能积累^[20]。

在人工繁育过程中由于亲本数量的限制和遗传漂变,导致一些多态和稀有位点的丢失,隐性纯合位点数增加,使人工繁殖群体遗传多样性降低^[21]。造成这种原因一方面可能是人工养殖翘嘴鳊时,为得到其高质量和高产量,人们经常筛选某一特定基因型的个体,从而使某些基因从该基因库中流失。此外,近亲交配也使得人工繁殖的翘嘴鳊遗传多样性下降。鱼类遗传多样性是改良鱼类品种和提高鱼类品质的物质基础,遗传多样性的降低或被破坏会给渔业生产带来损失^[22]。虽然人工繁殖群体遗传多态性水平一定低于天然群体,但是其生产性能却可以高于天然群体,例如抗逆性等。因此,广东省从江西南昌国家级翘嘴鳊原种场引进翘嘴鳊原种是非常有必要的,在未来的养殖过程中要增加亲本选育数量并检测选育群体的遗传多态性情况,防止和降低人工选育以及累代人工繁殖造成的近交和纯合化。这对我国集约化主产区广东省的鳊鱼产业向高效、优质的方向持续健康发展具有重要意义。

另外,鄱阳湖不同群体虽然存在一定差异性,但高的 H 值为通过分子选育等技术有效防止品

种退化提供了前提条件,并为保持遗传多样性水平,维持杂交选育优势提供了重要基础。这也在一定程度上说明定期补充不同地区不同群体的个体作为亲鱼进行繁育有利于保持鳊鱼人工繁殖群体的遗传多样性,避免了近亲繁殖和瓶颈效应。

参考文献:

- [1] 李新辉,吴淑勤,李凯彬,等. 鳊鱼病毒核酸的初步分析[J]. 水产学报, 2000, 24 (2): 171 - 174.
- [2] Zhao J L, Wang W W, Li S F, *et al.* Structure of the mitochondrial DNA control region of the siniperce fish and their phylogenetic relationship [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33 (9): 793 - 799.
- [3] Avise J C, Saunders N C. Hybridization and introgression among species of sun fish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers[J]. *Genetics*, 1984, 108(1): 237 - 255.
- [4] Nagata J, Masuda R, Tamate H B, *et al.* Two genetically distinct lineages of the Sika Deer, *Cervus Nippon*, in Japanese Islands: comparison of mitochondrial D-Loop region sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1999, 13 : 511 - 519.
- [5] 殷文莉,戴建华,杨代淑,等. 鳊及大眼鳊线粒体 DNA 比较研究[J]. 水生生物学报, 1998, 22(3): 257 - 264.
- [6] 杨受保. 鳊类的资源利用及遗传多样性研究[J]. 水产科技情报, 2003, 24(4): 33 - 35.
- [7] 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.
- [8] 杨受保,祖国掌,程久发. 鳊鱼遗传多样性的 RAPD 指纹分析[J]. 水产养殖, 2003 (4): 33 - 35.
- [9] Broughton R E, Milam J E, Roe B A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J]. *Genome Res*, 2001, 11 (11): 1958 - 1967.
- [10] 方耀林,张燕,杨焱清,等. 大鲵遗传多样性分析[J]. 淡水渔业, 2006, 6 (36): 8 - 11.
- [11] 王伟伟,赵金良,李思发,等. 我国斑鳊六个群体 mtDNA Cyt b 序列的遗传变异[J]. 动物学研究, 2006, 27 (6): 589 - 593.
- [12] 郑冰蓉,张亚平,肖春杰,等. 洱海鲤属鱼类同域分化形成的分子遗传学证据[J]. 遗传学报,

- 2004, 31(9):976-982.
- [13] 赵金良,李思发,蔡完其,等. 长江水系不同水体鳊 mtDNA 控制区序列的遗传分析[J]. 湖泊科学,2007, 19 (1):92-97.
- [14] 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.
- [15] 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 tool [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (24): 4876-4882.
- [16] Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19:2496-2497.
- [17] 郑向忠,徐宏发,陆厚基. 动物种群遗传异质性研究进展[J]. 生物多样性,1997,5 (3):210-216.
- [18] Wright S. *Evolution in Mendelian populations* [J]. *Genetics*,1931,16 :97-159.
- [19] 杨博,陈小勇,杨君兴. 白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析[J]. 动物学研究, 2008, 29 (4):379-385.
- [20] Avise J C. *Phylogeography the history and formation of species* [M]. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press, 2000.
- [21] 韩晓磊,徐建荣,李小蕊,等. 鳊鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 南京师大学报(自然科学版),2009,32 (1):110-114.
- [22] 杨星,杨军峰,汤明亮,等. 斑鳊种内遗传多态性以及翘嘴鳊的分子鉴别[J]. 水生生物学报, 2007,31(6):891-895.

Cultivated and natural populations of *Siniperca chuatsi* in Guangdong and Jiangxi: sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis

YANG Yu-hui¹, LIANG Xu-fang^{1*}, LIN Qun¹, LI Jin-guang¹, WANG Lin¹, XIE Jun²

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The mitochondrial DNA control region (D-loop) of *Siniperca chuatsi* was amplified by PCR using a pair of specific primers. The sequences with the complete nucleotide control region from *S. chuatsi* mitochondrial was cloned and directly sequenced. The length of this region (D-loop) contained 833 bp nucleotides and the T, C, A and G contents were 30.4%, 20.4%, 33.7% and 15.5% respectively. The genetic diversity of *S. chuatsi* from the Nanhai, Guangdong; Huizhou, Guangdong; Nanchang, Jiangxi and Poyang Lake (Jiangxi) was analyzed. The results indicated, compared to Jiangxi *S. chuatsi* species, *S. chuatsi* species in Guangdong have a problem that the quality of species has low polymorphism. The polymorphism analysis has evaluated *S. chuatsi*'s heredity multiple levels, provides the scientific basis for *S. chuatsi*'s idioplasm protection, provides the genetics background material for development and utilization of *S. chuatsi*'s resources, in order to formulate corresponding resources conservation measures. Meanwhile it is significantly meaningful that the intensification of China's main production area Guangdong Province's *S. chuatsi* industry should be promoted to highly effective, high-quality direction with sustainable healthy development.

Key words: *Siniperca chuatsi*; mitochondrial DNA; control region; genetic diversity

Corresponding author: LIANG Xu-fang. E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn