

# 基于细胞色素 b 基因的鱥浪白鱼野生群体和养殖群体遗传多样性分析

刘红艳<sup>1</sup> 熊 飞<sup>1,2</sup> 杨 东<sup>1</sup> 张繁荣<sup>1</sup> 余来宁<sup>1</sup>

1. 江汉大学生命科学学院, 武汉 430056; 2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008

**摘要** 为探讨鱥浪白鱼野生群体和养殖群体的遗传多样性, 测定了野生群体和养殖群体共 29 尾鱥浪白鱼的线粒体 DNA 细胞色素 b 基因的全序列。结果显示: 在所有个体 1 140 bp 序列中检测到 31 个变异位点, 其中 28 个转换位点, 3 个颠换位点, 发现 21 种单倍型。养殖群体的核苷酸多样性指数(0.003 38)和单倍型多样性指数(0.980 95)高于野生群体核苷酸多样性指数(0.003 21)和单倍型多样性指数(0.934 07)。野生群体和养殖群体内的遗传距离分别为 0.003 39 和 0.003 43, 群体间的遗传距离(0.003 64)略大于群体内遗传距离。分子变异分析(AMOVA)结果显示:  $F_{ST} = 0.064 1 (P < 0.01)$ , 即 6.41% 的变异来自群体间, 93.59% 的变异来自群体内, 变异大多发生在群体内, 野生群体和养殖群体间未发生显著的遗传分化。2 个群体 Tajima's D 检验、Fu 和 Li's D 与 F 检验均为负值, 表明 2 个群体的检验结果均偏离中性模式, 鱥浪白鱼群体可能受到群体扩张和自然选择的作用。

**关键词** 鱥浪白鱼; 野生群体; 养殖群体; 细胞色素 b 基因; 遗传多样性

**中图分类号** Q 953.5    **文献标识码** A    **文章编号** 1000-2421(2011)01-0094-05

鱥浪白鱼(*Anabarilius grahami*)是我国云南抚仙湖的特有鱼类<sup>[1]</sup>, 曾经是抚仙湖的主要经济鱼类, 但是自 20 世纪 80 年代太湖新银鱼引入抚仙湖后, 因银鱼生态位和食性与鱥浪白鱼相似, 极大地抑制了鱥浪白鱼生存; 另外过度捕捞、环境污染及产卵场的破坏, 导致近年来鱥浪白鱼群体数量急剧下降<sup>[2]</sup>。为了使鱥浪白鱼种群得以恢复, 有学者在其驯养、人工繁殖、增殖放流等方面做了大量的研究<sup>[3-4]</sup>, 但是如何合理地进行种群数量的补充、种群保护、人工选育和增殖放流, 还需对其遗传多样性进行深入分析。

分子标记为种群遗传结构提供了重要的量度。线粒体 DNA 遵守严格的母系遗传, 无遗传重组, 通常能够全面反映种群内和种群间的遗传变异, 被广泛的用于探讨种群遗传结构及遗传多样性研究。细胞色素 b(cytochrome b, Cyt b)基因的结构和功能在 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因中被了解得最为清楚, 且进化速度适中, 因此在鱼类群体与进化遗传学中的应用较为广泛。本研究对鱥浪白鱼线粒体

细胞色素 b 基因序列进行了测定, 比较了其野生群体和人工养殖群体的遗传多样性差异, 旨在为其群体遗传多样性评估、遗传育种提供科学指导, 同时为高原湖泊土著鱼类的资源保护和管理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

鱥浪白鱼样本共 29 尾, 野生群体样本 14 尾, 采自抚仙湖; 养殖群体样本 15 尾, 采自澄江县海口鱥浪白鱼繁殖基地。采集后取其背部肌肉, 用 95% 乙醇固定, 带回实验室备用。

### 1.2 总 DNA 的提取

将保存于乙醇中的肌肉样品取出, 剪取 20 mg 左右, 用 0.9% 的生理盐水浸泡约 12 h, 其间更换生理盐水 3~4 次, 除去乙醇, 加入 STE 600  $\mu$ L, 终质量分数为 2% 的 SDS 和终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 Protein K, 混匀后 56 °C 消化 5~6 h, 经酚-氯仿抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤后, 用适量灭菌蒸馏水溶解, -20 °C 存放。

收稿日期: 2010-06-10

基金项目: 国家自然科学基金(40901037)、湖泊与环境国家重点实验室开放基金(2010SKL011)与武汉市教育局市属高校科研项目(2009K057)

刘红艳, 讲师。研究方向: 鱼类分子遗传学。E-mail: lhy9603@126.com

通讯作者: 熊 飞, 博士, 讲师。研究方向: 湖泊生态学。E-mail: xiongfei@jhun.edu.cn

### 1.3 PCR 扩增及测序

引物采用线粒体 Cyt b 基因的通用引物, 上下游引物序列分别为 L14724: GACTTGAAAAAC-CACCGTTG, H15915: CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC<sup>[5]</sup>。PCR 反应总体积为 50 μL, 约 50 ng 的基因组 DNA 作为模板, 反应体系包括: 10 × Taq Buffer (Fermentas) 5 μL, Taq polymerase (Fermentas) 1 μL(1 U), dNTP (2.5 mmol/L) (Generay) 2 μL, 引物(20 mol/L) 1 μL, 其余为灭菌蒸馏水。扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min 后, 35 个循环(94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min), 最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶回收纯化, 送至上海美季生物公司双向测序。

### 1.4 数据分析

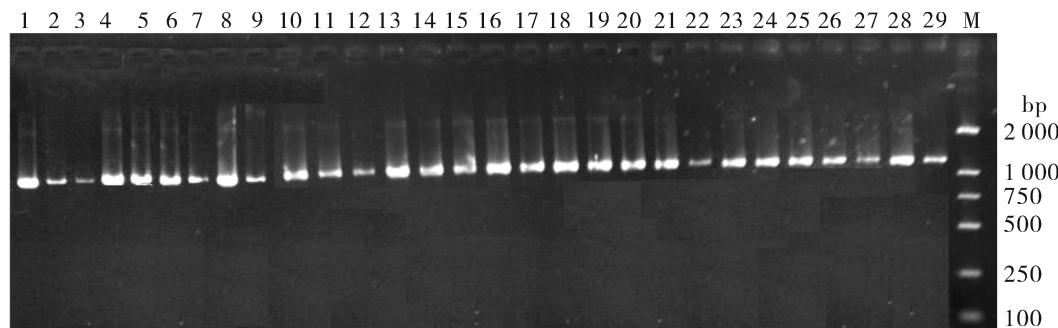
用 ClustalX1.83 进行序列比对。用 Mega3.0 软件中的 Statistics 统计 DNA 序列的碱基组成, 以 Kimura 2-parameter 模型计数群体遗传距离。用 DNAsP4.10(DNA Sequences Polymorphism)软件计算多态性位点 S (number of variable sites)、单倍型数 h(number of haplotypes)、单倍型多样性指数 Hd(haplotype diversity) 和核苷酸多样性指数 π (nucleotide diversity)。用 Arlequin 3.01 软件进行中性检验, 计算 Tajima's D 值、Fu 和 Li's D 值与

F 值。用分子变异分析法 (analysis of molecular variance, AMOVA) 分析群体间遗传分化指数  $F_{ST}$ , 并用排列测验法(Permutation test)检测其显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列变异和单倍型

从鱥浪白鱼 29 个个体基因组 DNA 中成功扩增出细胞色素 b 基因约 1 200 bp 的片段(图 1), 测序获得了鱥浪白鱼的 1 140 bp 细胞色素 b 基因全序列, 序列中无碱基的缺失或插入, 这主要是因为 Cyt b 基因是蛋白质编码基因, 对于蛋白质编码区域而言, 由于蛋白质功能上的需要和三联体密码结构的限制, 缺失/插入很少发生或发生后很容易被选择淘汰。变异位点中共检测到 31 个变异位点(2.71%), 其中多态性信息位点 12 个, 单碱基变异位点 19 个, 28 个转换位点, 3 个颠换位点, 转化和颠换的比例为 9.33 : 1, 转化位点中绝大多数为 A-G 之间的转换。由 Mega3.0 中的 Statistic 统计可知 A、T、C、G 的含量, 其平均值分别为 25.8%、26.7%、29.8% 和 17.7%。A+T 含量为 52.5%, 大于 G+C 含量(47.5%)。同时, Cyt b 基因表现出很强的碱基组成偏向性, 即在 A、T、C、G 4 种碱基中, G 的含量明显低于其他 3 种碱基的含量。



1-14 为野生样品 Cyt b 基因扩增条带; 15-29 为养殖样品 Cyt b 基因扩增条带。 1-14: Cyt b gene PCR bands of 14 wild samples; 15-29: Cyt b gene PCR bands of 15 cultured samples; M: Marker (DL 2 000).

图 1 线粒体 Cyt b 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of mtDNA cytochrome b gene

29 个样本中共发现了 21 种单倍型(表 1), Hap\_1 和 Hap\_5 为野生群体和养殖群体共享单倍型, 频率为 24.1%, 其他 19 种单倍型为群体所独有, 其中 8 种单倍型为野生群体独有, 11 种单倍型为养殖群体独有, 群体独有单倍型频率为 75.9%。

### 2.2 遗传多样性

由表 2 可知, 鱥浪白鱼养殖群体的单倍型数(13)、多态性位点数(23)、核苷酸多样性指数(0.003 38)和单倍型多样性指数(0.980 95)均高于养殖群体的单倍型数(10)、多态性位点数(16)、核苷酸多样性指数(0.003 21)和单倍型多样性指数



表4 鱲浪白鱼线粒体Cyt b基因的中性检验结果

Table 4 Results of neutral test for natural selection on mtDNA  
Cyt b gene of *Anabarilius grahami* population

群体 Population	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F
野生 Wild ( $P > 0.10$ )	-0.930 52	-1.563 91 ( $P > 0.10$ )	-1.595 90 ( $P > 0.10$ )
养殖 Cultured ( $P < 0.05$ )	-1.887 60	-1.964 14 ( $P > 0.05$ )	-2.235 20 ( $P > 0.05$ )

提示群体的检验结果均偏离中性模式,野生群体3种方法的结果均未达到统计学的显著性差异,养殖群体只有 Tajima's D 值达到显著性差异。

### 3 讨 论

一般认为,由于人工繁殖过程中影响群体遗传多样性的瓶颈效应、遗传漂变和近亲杂交等因素,养殖群体会不可避免地丧失某些特定的等位基因,因此造成养殖群体的遗传变异度及遗传多样性水平均低于野生群体的状况,这在很多养殖鱼类的检测中已得到证实<sup>[6-8]</sup>。而在本研究中,鱲浪白鱼养殖群体的遗传变异度及遗传多样性高于野生群体的,这与杨博等<sup>[9]</sup>用线粒体控制区对鱲浪白鱼群体遗传研究结果一致。这可能是由于繁殖群体来源于长期引入不同地点的鱲浪白鱼群体,这些具有多龄结构的补充群体避免了近亲繁殖和瓶颈效应,有利于保持鱲浪白鱼人工养殖群体的遗传多样性。本试验中,我们检测到的核苷酸多样性指数  $\pi$  值(0.003 51)和单倍型多样性指数 Hd 值(0.967 98)略低于用控制区序列检测的  $\pi$  值(0.004 34)和 Hd 值(0.996),这可能是由于在鱲浪白鱼中细胞色素 b 基因的进化速度低于控制区的进化速度而造成的。Zardoya 等认为鱼类 mtDNA 不同区域的进化速度存在差异,控制区的进化速率比细胞色素 b 基因的进化速率快<sup>[10]</sup>,鱲浪白鱼的研究结果与此相符。

鱲浪白鱼线粒体细胞色素 b 基因具有较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性。鱲浪白鱼个体小、性成熟周期短(2周年性成熟)、繁殖季节较长(每年的3—10月),产卵场较集中(在抚仙湖东、西岸的溶洞出水口处产卵),这样的生活特性可能对群体快速增长和保存新突变、产生高的 Hd 值有一定的贡献作用。本研究中,鱲浪白鱼 Cyt b 基因共有 31 个变异位点,单碱基变异位点就有 19 个,占总变异位点的 61.3%,单碱基变异位点过多可能造成了群体较低的  $\pi$  值。鱲浪白鱼这种高 Hd 值、低  $\pi$  值的现象在中华沙鳅、铜鱼、珊瑚鱼、鞍斑锦鱼和霓虹雀鲷中也存在<sup>[11-15]</sup>。Grant 等<sup>[16]</sup>对 Hd 值和  $\pi$  值大

小变化进行了分析,指出高 Hd 值和低  $\pi$  值的原因可能是由于种群是由一个较小的有效群体快速扩张而来的,这些群体的许多种类可能起源于上新世或更新世早期。

Avise 认为 Cyt b 基因序列在同一物种内个体间的遗传距离为 0~4.06%<sup>[17]</sup>。从本研究细胞色素 b 基因序列数据来看,无论是野生群体还是养殖群体,群体间(0.003 64)和群体内(0.003 39 和 0.003 43)的遗传距离都较小。鱲浪白鱼仅分布于抚仙湖,处于抚仙湖较为均质性环境条件中,这可能会造成遗传变异较小的状况。另外在繁殖季节,抚仙湖不同湖区的鱲浪白鱼亲鱼都集中在溶洞出水口产卵,这可能增加了各区域鱲浪白鱼间的相互交配,使得产卵区的基因交流活跃。

为检测分子水平上群体扩张和自然选择作用的存在,生物统计学家先后发展了一些方法来检测分子水平的群体扩张和自然选择作用。其中,种或种群内部的群体扩张和自然选择作用主要以 Tajima 检验及 Fu 和 Li 检验为代表<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,Tajima 值及 Fu 和 Li 值都是负值,3 种检测方法均支持鱲浪白鱼群体受到群体扩张和自然选择作用。这可能与抚仙湖特定的湖泊演变历史有关,抚仙湖为上新世晚期喜马拉雅运动时期形成的断陷型湖泊,这个时期的抚仙湖为富营养沼泽浅湖,湖内水生植物茂盛,食物丰富,适于鱼类群体的快速生长<sup>[1]</sup>。鱲浪白鱼可能起源于这个时期,并经历了一个群体快速扩张过程,形成了现今群体的遗传多样性特性。全新世时期抚仙湖由浅变深和贫营养化,使鱲浪白鱼在长期的进化过程中逐渐出现与抚仙湖环境相适应的遗传性状,如鱲浪白鱼体型细长、生长速度较慢、繁殖季节较长、个体繁殖力较低、种群的性别比悬殊等特有的遗传性状可能是适应抚仙湖贫营养型生活环境自然选择作用的结果。

### 参 考 文 献

- [1] 杨君兴,陈银瑞. 抚仙湖鱼类生物学和资源利用 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1995.
- [2] 李再云,陈银瑞,杨君兴. 鳲浪白鱼的生物学及其种群衰减原因分析 [J]. 淡水渔业, 2003, 33(1): 645-653.
- [3] 杨君兴. 云南抚仙湖鱲浪白鱼若干生物学特性的形成和演化及其与湖泊环境演变的关系 [J]. 动物学研究, 1994, 15(2): 1-9.
- [4] 张培清. 鳲浪白鱼人工繁殖试验 [J]. 淡水渔业, 2003, 32(1): 31-32.
- [5] XIAO W, ZHANG Y, LIU H. Molecular systematics of Xenocyprinidae (Teleostei; Cyprinidae): taxonomy biogeography and

- coevolution of a special group restricted in east Asia [J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 18(2): 163-173.
- [6] 张志伟, 韩曜平, 仲霞铭, 等. 草鱼野生群体和人工繁殖群体遗传结构的比较研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 720-725.
- [7] 王伟继, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶遗传差异[J]. 生物多样性, 2000, 8(4): 391-396.
- [8] 尹绍武, 李建中, 周工健, 等. 黄鳝野生群体和养殖群体遗传结构的 RAPD 分析[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 328-332.
- [9] 杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鲢浪白鱼线粒体 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.
- [10] ZARDOYA R, MEYER A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. Mol Biol Evol, 1996, 13(7): 933-942.
- [11] 刘红艳, 陈大庆, 刘绍平, 等. 长江上游中华沙鳅遗传多样性研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(3): 8-12.
- [12] 廖小林. 长江流域几种重要鱼类的分子标记筛选开发及群体遗传分析[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.
- [13] FAUVELOT C, BERNARDI G, PLANES S. Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change[J]. Evolution, 2003, 57: 1571-1583.
- [14] CHEN C A, ABLAN M C A, MACMANUS J W, et al. Mitochondrial DNA analysis of the genetic structure among populations of *Hardwicki wrass*, *Thallasoma hardwicki*, in the northern South China Sea[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 312-326.
- [15] LIU S Y V, KOKITA T, DAI C F. Population genetic structure of the neon damselfish (*Pomacentrus coelestis*) in the northwestern Pacific Ocean [J]. Mar Biol, 2008, 154: 745-753.
- [16] GRANT S W, BOWEN B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insight from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. J Hered, 1998, 89: 415-426.
- [17] AVISE C. Introduction: the scope of conservation genetics [M]. New York: Chapman & Hall, 1998.
- [18] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. Genetics, 1989, 123: 185-195.
- [19] FU Y X, LI W X. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. Genetics, 1993, 133: 693-709.

## Mitochondrial cytochrome b gene sequence diversity in wild and cultured populations of *Anabarilius grahami*

LIU Hong-yan<sup>1</sup> XIONG Fei<sup>1,2</sup> YANG Dong<sup>1</sup> ZHANG Fan-rong<sup>1</sup> YU Lai-ning<sup>1</sup>

1. Life Science College, Jianghan University, Wuhan 430056, China;  
2. State Key Laboratory of Lake Science and Environment,  
Nanjing Institute of Geography and Limnology,  
Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

**Abstract** Genetic diversity of a wild population and a cultured population from *Anabarilius grahami* was measured based on cytochrome b gene of the mitochondrial. Fourteen and fifteen unrelated individuals were chosen in wild and cultured populations, respectively. Twenty-one haplotypes were identified. The cultured population exhibited higher average nucleotide diversity ( $\pi$ ) and haplotype diversity (Hd) than the wild population. The genetic distances of the wild and the cultured populations were 0.003 39 and 0.003 43, respectively. The distance of inter-population (0.003 64) was larger than that of intra-population. AMOVA analysis demonstrated that  $F_{ST}$  was 0.064 1 ( $P < 0.01$ ). Small variance occurred between the two populations (6.41%) and large part of the variance occurred within populations (93.59%). It implied that genetic variance mainly existed among intra-populations. No significant genetic differentiation was observed between the wild and cultured populations. The values from Tajima's D, Fu and Li's D and F of neutrality tests were all negative. It suggested that the test results of two *A. grahami* populations departed from neutrality model, which indicated that populations of *A. grahami* were possibly experienced population expansion and natural selection.

**Key words** *Anabarilius grahami*; wild population; cultured population; cytochrome b gene; genetic diversity

(责任编辑:边书京)