

小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环的 序列变异及遗传多样性

代应贵 韩 雪 张晓杰

(贵州大学动物科学学院 贵阳 550025)

摘要: 采用 PCR 结合 DNA 测序技术,测定分析了易危鱼类小口白甲鱼 (*Onychostoma lini*) 都柳江种群 36 个个体的 mtDNA D 环约 470 bp 序列的变异及遗传多样性。结果表明,在 36 个个体中,该序列的长度为 469 ~ 475 bp,其碱基组成为 A + T 的平均含量 (68.4%) 高于 G + C (31.6%)。共检测到 25 个多态位点,其中转换 19 个、颠换 6 个。核苷酸多样性 (π) 为 0.005 75,平均核苷酸差异数 (K) 为 2.695。36 个个体分属 5 个单倍型,单倍型多样性 (Hd) 为 0.260,单倍型间的平均遗传距离 (P) 为 0.026。5 个单倍型构建的 UPGMA 系统树聚为 2 个分支。目前小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环序列存在着较丰富的变异和遗传多样性。

关键词: 小口白甲鱼; mtDNA; D 环; 测序; 遗传多样性

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2010) 02-115-06

Genetic Diversity and Sequence Variation of mtDNA D-loop in the Population of Vulnerable Species *Onychostoma lini* from the Dulu River

DAI Ying-Gui HAN Xue ZHANG Xiao-Jie

(College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The genetic diversity and sequence variation of mtDNA D-loop in the population of vulnerable species *Onychostoma lini* from the Dulu River in Guizhou were studied for the first time on the basis of determination of about 470 bp sequences of mtDNA D-loop in 36 individuals by the methods of PCR and DNA sequencing. The results showed that the length of the determined sequence in 36 individuals varied from 469 to 475 bp, and the total percentage of bases A and T (68.4%) was more than that of bases G and C (31.6%) in the sequence. A total of 25 polymorphic loci, including 19 transitions and 6 transversions, were detected in the sequence of the population. The nucleotide diversity (π) of the 36 individuals was 0.005 75, and the average number of nucleotide differences (K) of them was 2.695. The 36 individuals belonged to 5 haplotypes according to the determined sequences. The haplotypic diversity (Hd) was 0.260, and the average genetic distance (P) between the haplotypes of the population was 0.026. The UPGMA phylogenetic tree of the 5 haplotypes comprised 2 branches. The data show that the population of *O. lini* in the Dulu River has abundant variation in mtDNA D-loop sequence and high genetic diversity, which may play an important role in the conservation and

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30760189, 30960297), 贵州省科学技术基金项目 [黔科合 J 字 (2007) 2062], 贵州省省长基金项目 [黔省专合字 (2005) 347];

第一作者介绍 代应贵,男,教授;研究方向:鱼类学和水产资源学;E-mail: Daiygui@163.com。

收稿日期: 2009-08-06, 修回日期: 2009-12-27

recovery of the species.

Key words: *Onychostoma lini*; mtDNA; D-loop; Sequencing; Genetic diversity

在保护生物学中,生物的遗传多样性保护占据着非常重要的地位。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 具有进化速率快、种内变异大、分子结构简单、基本序列清楚及严格的母系遗传等特点,是群体遗传学研究中最有效和最灵敏的 DNA 区域之一,能够反映物种内亚种、种群的遗传多样性,因而成为保护生物学及生物遗传多样性研究的热点^[1-3]。mtDNA 的 D 环是其中一段非编码区,长度约为 1 kb,由于受选择压力较小,在进化过程中积累了较多的变异,被认为是线粒体 DNA 进化最快的区段^[4],通过检测该区段 DNA 序列的变异可以有效地鉴别和评估群体遗传多样性的水平。

小口白甲鱼 (*Onychostoma lini*) 属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae) 白甲鱼属,主要分布于沅江水系、珠江水系和闽江水系^[5]。多年来,其种群数量日趋减少,种质资源正濒临消失的危险,现已被列为易危鱼类^[6]。小口白甲鱼在贵州主要分布在隶属于沅江水系的清水江和隶属于珠江水系的都柳江^[7],是当地的名贵经济鱼类。近年来,小口白甲鱼在贵州境内清水江已基本不见踪迹;在都柳江也仅见于榕江县古州镇至兴华乡之间的河段,因下游水电站建坝而形成为一个近似孤立的种群,数量极为稀少。到目前为止,有关小口白甲鱼的研究资料仅限于其形态、分类、分布等方面^[5-7]。

本研究通过对分布于贵州都柳江的小口白甲鱼种群 mtDNA D 环序列进行 PCR 扩增和测序,分析该种群 mtDNA D 环的序列变异及遗传多样性,以期对小口白甲鱼都柳江种群的保护提供科学依据和基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验所用的 36 尾小口白甲鱼鲜活个体,形态正常,于 2008 年 10 月采自贵州境内榕江县古州镇至兴华乡之间的都柳江河

段。采样河段长约 60 km,每隔 15 km 左右采集小口白甲鱼 8~10 个个体,按照单乡红等^[5]的方法进行小口白甲鱼标本鉴定。每个鲜活个体捕获后立即解剖取新鲜的肌肉样品用酒精固定,保存于 -20℃ 冰箱,待用。

1.2 总 DNA 的提取 采用恒因生物公司的 DNA 提取试剂盒及所提供的方法从肌肉样品中提取总 DNA。

1.3 PCR 扩增、产物纯化及序列测定 使用引物^[8-9] L16521: 5'-TCACCCCTGGCTCCCAAAGCCAG-3' 和 H427: 5'-TGCATATAAAAGAATGCCGGCATG-3' 进行 D 环区约 500 bp 碱基的正反链双向扩增。PCR 反应总体积为 20 μl,反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 40 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,40 个循环后,72℃ 后延伸 5 min。PCR 产物用 1.5%~2.0% 的琼脂糖凝胶检测,用小量胶回收试剂盒进行回收纯化,并送上海恒因生物公司进行正反双向测序。

1.4 数据分析 DNA 序列通过 DNASTar 软件包进行排序,并人工校正。每一碱基均经过正、反向测序验证。碱基组成和转换、颠换采用 MEGA 软件进行统计。用 MEGA 软件计算个体间的遗传距离,并构建系统树。采用 DNASP 软件计算遗传多样性参数。

2 结果

2.1 mtDNA D 环序列 PCR 扩增结果 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),未发现非特异性条带,空白对照组未出现扩增产物,可以排除外源 DNA 污染及核 DNA 拷贝的可能性。

2.2 mtDNA D 环序列核苷酸组成的特点及长度变异 测序显示,本研究中小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环序列长度为 469~475 bp (除去引物及部分尾部序列),平均长度为 470 bp。序列长度变异体现在有 3~4 个位点出现

缺失 T 和 2 个位点出现缺失 A (表 1)。该序列中 4 种碱基的含量以 A 最高,平均为 34.6%。其次, T、C 的平均含量分别为 33.8%、18.6%。

而以 G 的平均含量最低,仅为 13.0%。A + T 的平均含量 (68.4%) 显著高于 G + C (31.6%)。

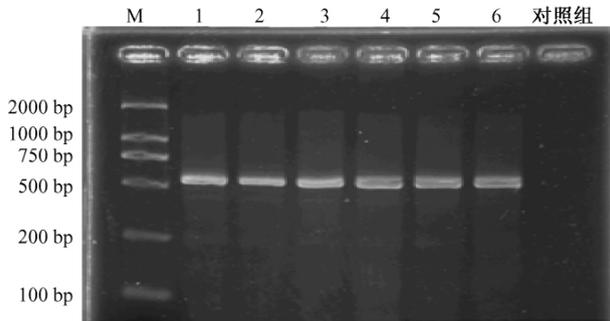


图 1 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环部分序列扩增电泳图

Fig. 1 PCR result of mtDNA D-loop partial sequence in the population of *Onychostoma lini* from the Dulu River

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1~6. 样品。M. DL2000 DNA marker; 1~6. The sample codes.

表 1 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环序列的变异位点及单倍型

Table 1 Variable loci and haplotypes of mtDNA D-loop in the population of *Onychostoma lini* from the Dulu River

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable locus	个体数 Number of specimen	GenBank 登录号 GenBank acc. no.
	1111112 222222222 2233334444 4		
	5791477891 2233333467 8813391677 7		
	3529669058 8934567507 5743464902 3		
Hap1	AACTTTAATT ACTTTTCAT ATTTAGCATT T	1	GQ412153
Hap2	...-...-...	1	GQ412154
Hap3	...-...-...	1	GQ412155
Hap4	...-...-...	31	GQ412156
Hap5	GGT-C-...- GTCACCTGC TCCCGTTAG C	2	GQ412157

圆点(.)表示与 Hap1 相同的碱基;横线(-)表示与 Hap1 相比缺失的碱基。

Dots(.) mean the same bases in haps 2-5 as in Hap1, and dashes(-) represent default bases in haps 2-5.

2.3 mtDNA D 环序列核苷酸位点的突变类型与多态性 在 36 尾小口白甲鱼 mtDNA D 环区测序得到的序列中,共计发现了 31 个变异位点,变异位点数占总位点数的 6.53% (表 1)。其中转换 19 个,占总变异位点数的 61.3%;颠换和缺失均为 6 个,各占 19.4%。转换位点数显著多于颠换,转换与颠换的比值为 3.17:1。没有出现转换与颠换同时存在的位点。

DNASP 软件分析显示,该 36 个小口白甲

鱼个体 mtDNA D 环区测得的序列共有 25 个多态位点(表 1)。其中单一多态位点 1 个,位置为:470;两碱基间简约信息位点 24 个,其位置分别为:53、75、92、176、228、229、233、234、235、236、237、245、260、277、285、287、314、333、334、396、414、469、472、473。36 个个体的分属 5 种单倍型(表 1)。以单倍型 4(Hap4)包含的个体数最多,达 31 个,其次,单倍型 5(Hap5)有 2 个个体,而其余单倍型均为 1 个个体。与单倍型 1

相比,单倍型 2 含有 1 个颠换位点和 5 个缺失位点,单倍型 3 含有 1 个转换位点、2 个颠换位点和 5 个缺失位点,单倍型 4 含有 1 个转换位点、3 个颠换位点和 5 个缺失位点,单倍型 5 含有 19 个转换位点、6 个颠换位点和 6 个缺失位点。从多态位点的分布来看,单倍型 5 与其他 4 种单倍型之间碱基组成差异尤为显著。

2.4 mtDNA D 环序列的遗传多样性及 UPGMA 分子系统树 利用 DNASP 软件计算了小口白甲鱼 36 个个体的 mtDNA D 环序列的遗传多样性指数。结果表明,单倍型多样性 (H_d) 为 0.260,核苷酸多样性 (π) 为 0.005 75,平均核苷酸差异数 (K) 为 2.695 (表 2)。

表 2 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA 多样性

Table 2 mtDNA diversity in the population of *Onychostoma lini* from the Duliu River

遗传多样性指数 Genetic diversity indices	数值 Value
多态性位点数 Number of polymorphism sites, S	25
单倍型数 Number of haplotypes, H	5
单倍型多样性 Haplotypes diversity, H_d	0.260
核苷酸多样性 Nucleotide diversity, π	0.005 75
平均核苷酸差异数, K	2.695
Average number of nucleotide defenses	

应用 MEGA 软件,根据 D 环序列计算了 5 个单倍型之间的遗传距离 (表 3)。从表 3 可

见 ①5 个单倍型中任何 2 个单倍型间遗传距离均不为 0,即任意 2 个单倍型之间的核苷酸序列均不完全相同;②单倍型 1 与单倍型 5 之间遗传距离最大,达 0.055 7;③单倍型 1 与单倍型 2 之间、单倍型 3 与单倍型 4 之间的遗传距离最小,均为 0.002 1;④单倍型的平均遗传距离 (P) 为 0.026。

以南方白甲鱼 (*O. gerlachi*) 的同源序列 (GenBank 登录号: EF123777) 为外群,根据遗传距离构建了小口白甲鱼都柳江种群单倍型的 UPGMA 分子系统树 (图 2)。结果显示 5 种单倍型聚为 2 个分支。其中一个分支为单倍型 5,代表 2 个个体。其余单倍型构成另一个分支,包含 34 个个体;支持该分支的 Bootstrap 值高达 100。

表 3 小口白甲鱼都柳江种群单倍型间的遗传距离

Table 3 The genetic distances between mtDNA haplotypes in the population of *Onychostoma lini* from the Duliu River

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5
Hap1					
Hap2	0.002 1				
Hap3	0.006 4	0.004 3			
Hap4	0.008 6	0.006 4	0.002 1		
Hap5	0.055 7	0.053 5	0.048 9	0.046 6	

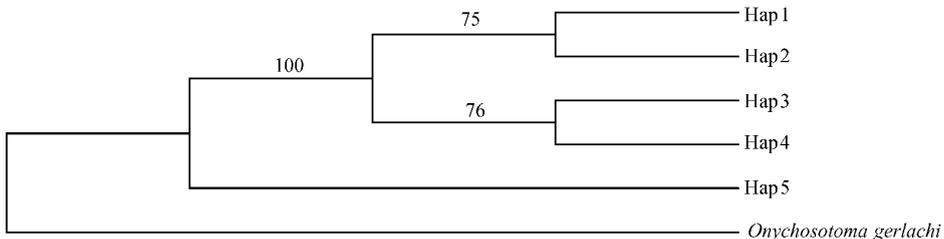


图 2 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA 单倍型 UPGMA 分子系统树

Fig. 2 The UPGMA phylogenetic tree of mtDNA haplotypes in the population of *Onychostoma lini* from the Duliu River

树枝处的数字为 Bootstrap 值,重复次数为 1 000 次; Haps 1 ~ 5 代表不同的单倍型; *Onychostoma gerlachi*: 南方白甲鱼。

The numbers above each branch indicate the statistical support obtained from 1 000 bootstrap replicates;

Haps 1 - 5 represent haplotypes.

3 讨论

3.1 mtDNA D 环区长度变异 D 环是 mtDNA

中碱基变异最大的区域,D 环碱基变异可以导致 mtDNA 长度的变化^[10]。同一个体,如只有一种长度的 mtDNA 为同质体,如有两种或两种

以上长度的 mtDNA 则为异质体^[11-12]。个体间 mtDNA D 环长度变异可以反映群体 mtDNA 长度变异的情形^[12]。本研究中,小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环区序列为 469 ~ 475 bp,序列长度变异表现为 3 ~ 4 个位点缺失 T、2 个位点缺失 A。可见,36 个小口白甲鱼个体间 mtDNA 长度存在变异。然而,在电泳实验中,每个小口白甲鱼个体 mtDNA D 环扩增序列电泳条带单一。由此表明,本研究中 36 个小口白甲鱼个体均为同质体,而未发现个体内的异质现象。

3.2 mtDNA D 环区序列变异 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环 469 ~ 475 bp 的序列中,碱基组成以 A 的含量最高,以 G 的含量最低。该序列中,共计发现了 31 个变异位点。其中,碱基替换位点 25 个。在碱基替换位点中,碱基转换位点数显著多于颠换,转换与颠换的比值为 3.17 : 1。此外,还发现了 6 个碱基缺失位点。碱基缺失位点数显著少于碱基替换位点数,碱基替换位点数是缺失位点数的 4.17 倍。我们的研究结果与郑冰蓉等^[13]采用相同 DNA 引物对鲤属 (*Cyprinus*) 鱼类 mtDNA D 环序列变异的研究结果基本一致。这反映了鲤科鱼类 mtDNA D 环序列组成和变异的共同特点。

3.3 遗传多样性 应用 mtDNA 测序技术来研究物种的遗传多样性时,通常用两个重要指标来衡量一个群体 mtDNA 的遗传变异程度。一个是单倍型间的平均遗传距离 (P)。大多数动物的 P 值都在 0.01 以上,被认为变异大^[14]。本研究中,小口白甲鱼单倍型间的平均遗传距离 (P) 为 0.026,大于 0.01,这说明小口白甲鱼都柳江种群遗传变异较大。衡量一个群体 mtDNA 遗传变异程度的另一个指标是核苷酸多样性 (π)。核苷酸多样性 (π) 是指给定群体内的两个随机个体 mtDNA 序列间平均每个位点的核苷酸差异数目^[15]。根据 Nei 和 Li 的定义^[16],给定群体内两个随机选取的 mtDNA 序列间 π 值越小,表明群体的遗传多样性越低。由于 π 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中比例,因此在反映一个群体 mtDNA 的多态程度时比单

纯的平均遗传距离更可靠。Lan 和 Shi 认为,当 π 值在 0.001 5 ~ 0.004 7 时,群体的遗传多样性较低^[14]。本研究中,小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环核苷酸多样性 (π) 为 0.005 75,比同分布于高原地区的云南倒刺鲃 (*Spinibarbus denticulatus yunnanensis*) (0.001 35)^[17]、鳙白鱼 (*Anabarrilius grahami*) (0.004 34)^[18] 等种群高,也高于分布于长江的铜鱼 (*Coreius heterodon*) 种群 (0.002 18)^[19]。因而,目前小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环序列存在着较丰富的遗传多样性。同时,mtDNA 母系遗传特性使得相对少的个体即可代表该群体的有效样本,即有效群体小^[20],因此本研究中由 36 个小口白甲鱼个体组成的随机群体能够反映小口白甲鱼都柳江种群遗传多样性的现状。

都柳江是分布于贵州南部喀斯特地区的浅水河流,沿江分布有较多的支流、滩涂,地下溶洞发育。都柳江水位常随季节、降雨的变化而出现骤涨骤消甚至断流的情况,易于形成分割或半分割的水域生境,生境类型多样,生态多样性较高。与生境类型相对较少、不容易隔离的大水体中鱼类种群如高原湖泊抚仙湖鳙白鱼种群、青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 种群及长江铜鱼种群和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 种群相比,分布于都柳江中的小口白甲鱼种群个体更易于产生遗传漂变和分化,进而使整个种群形成了较高的遗传多样性。

由于线粒体 DNA 属于母系遗传,根据构建的 UPGMA 分子系统树 (图 2) 及碱基组成的差异 (表 1),可以推断小口白甲鱼都柳江种群这 36 个体很可能来源于 2 个具有明显遗传差异的不同母系。Shaklee 等^[21]提出了鱼类在属、种和种群三级水平上遗传距离 P 值分别为 0.9、0.30、0.05 的分类判别标准。本研究中,小口白甲鱼都柳江种群单倍型间的平均遗传距离 (P) 仅为 0.026,可见其遗传分化尚未达到种群分化的水平。

3.4 小口白甲鱼都柳江种群遗传多样性的保护 遗传多样性是评价一个物种进化潜力高低、抵制自然界各种生存压力的能力强弱的重

要指标,是针对濒危物种制定有效保护策略和措施的科学依据之一^[22-23]。研究表明,遗传多样性的丧失会对物种生存带来直接的不利影响,遗传多样性的丧失可以使物种更加容易灭绝^[24]。小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA 丰富的遗传多样性为该物种的适应能力、生存能力及进化潜力提供了潜在的遗传基础和储备。可见,小口白甲鱼都柳江种群目前尚保存着的丰富的遗传多样性,对于保护小口白甲鱼这一易危物种具有重要的现实意义。

近年来都柳江流域生态环境的改变、过度捕捞、水坝修建、水质污染等已导致小口白甲鱼种群数量急剧减少,进而将降低其遗传多样性和对环境的适应能力。因此,必须开展小口白甲鱼都柳江种群及其遗传多样性的保护。

参 考 文 献

- [1] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报,2000,24(4): 384-391.
- [2] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报,2004,31(9): 983-1000.
- [3] 陈伟,李钰,陈宇. 中国北方汉族人 mtDNA D 环多态性研究. 中华医学遗传学杂志,1999,16(4): 246-248.
- [4] Rosel P E, Haygood M G, Perrin W F. Phylogenetic relationship among the true porpoise (Cetacean phocoenidae). *Mol Phy Evol*, 1995, 4(4): 463-474.
- [5] 单向红,林人端,乐佩琦,等. 鲃亚科//乐佩琦. 中国动物志:硬骨鱼纲:鲤形目:下卷. 北京:科学出版社,2000,3-170.
- [6] 汪松,解焱. 中国物种红色名录:第一卷:红色名录. 北京:高等教育出版社,2004,160.
- [7] 伍律. 贵州鱼类志. 贵阳:贵州人民出版社,1989,150.
- [8] Kong Q P, Yao Y G, Huang S Y, et al. Mitochondrial DNA control region and cytochrome b sequence variation in the genus *Mystacoleucus* Gunther (Pisces: Cyprinidae: Barbinae) from China. *Biochemical Genetics*, 2003, 41: 305-313.
- [9] 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. 水产学报,2009,33(2): 196-200.
- [10] 白俊杰,劳海华,叶星,等. 剑尾鱼线粒体 DNA D-环及侧翼 tRNAt_{thr} 和 tRNA_{pro} 序列与结构分析. 中国水产科学,2003,10(2): 89-92.
- [11] 季维智,宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州:浙江科学技术出版社,1999.
- [12] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, 48(suppl 1): 80-94.
- [13] 郑冰蓉,张亚平,肖茵,等. 鲤属鱼类 mtDNA 控制区(D-环区)序列的变异性分析. 水产学报,2002,26(4): 289-294.
- [14] Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in south west China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism. *Biochemical Genetics*, 1993, 31: 51-60.
- [15] Neigel J E, Avise J C. Application of random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. *Genetics*, 1993, 135(4): 1209-1220.
- [16] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS*, 1979, 76: 5269-5273.
- [17] 郑冰蓉,张亚平. 云南倒刺鲃 mtDNA D 环区序列的遗传多样性研究. 水利渔业,2002,22(3): 15-16.
- [18] 杨博,陈小勇,杨君兴. 鳊白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群多样性分析. 动物学研究,2008,29(4): 379-385.
- [19] 严莉. 长江铜鱼种群生物学及遗传多样性分析. 武汉:华中农业大学硕士学位论文,2005.
- [20] Ward R D, Payne P. Appraisal of molecular genetic technique in fisheries. *Rev Fish Biol Fish*, 1994, 4: 3000-3257.
- [21] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. *Pacific Science*, 1982, 36(2): 141-157.
- [22] Frankham R, Ralls K. Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature*, 1998, 392: 441-442.
- [23] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 78-104.
- [24] Frankham R. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 1995, 29: 305-327.