

安徽河川沙塘鳢不同地理群体遗传多样性和遗传结构研究

张 焯^{1,2}, 凌 俊^{1,2*}, 段国庆^{1,2}, 胡玉婷^{1,2}, 潘庭双^{1,2}, 周华兴^{1,2}, 江 河^{1,2}

(1. 安徽省农业科学院水产研究所, 合肥 230031; 2. 水产增殖安徽省重点实验室, 合肥 230031)

摘 要: 为探究安徽河川沙塘鳢不同地理群体遗传多样性差异和遗传分化水平, 研究采集了安徽长江、新安江流域的 4 个地理群体, 共 142 个河川沙塘鳢样本。选择线粒体基因作为分子标记, 进行测序与分析。结果显示, 标记全长 1 291 bp, 包含 52 个变异位点, 定义了 15 个单倍型。4 个群体总体遗传多样性水平远高于群体内遗传多样性水平, 分子变异主要来源于群体间。所有群体形成了 3 个反映物种的地理分布关系的支系, 且未曾发生过扩张。河川沙塘鳢群体间的分化程度很高, 具有较高的保护和选育价值。

关键词: 河川沙塘鳢; 不同地理群体; 线粒体基因标记; 群体遗传分析

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0383-06

Genetic diversity and population structure analyses of *Odontobutis potamophila* from different geographic populations in Anhui Province

ZHANG Ye^{1,2}, LING Jun^{1,2}, DUAN Guoqing^{1,2}, HU Yuting^{1,2}, PAN Tingshuang^{1,2}, ZHOU Huaxing^{1,2}, JIANG He^{1,2}

(1. Fisheries Research Institution, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei 230031;

2. Key Laboratory of Aquaculture and Stock Enhancement in Anhui Province, Hefei 230031)

Abstract: In order to clarify the genetic diversity and differentiation of *Odontobutis potamophila* from different geographic populations in Anhui Province, 142 individuals from the Yangtze River and Xin'an River Basin were collected. The mitochondrial genes were chosen as the marker to analyze. A total of 1 291 bp marker was obtained which contained 52 variable sites and defined 15 haplotypes. The genetic diversity of four populations was higher than intra-populations, and the molecular variation was mainly from inter-populations. All populations gathered three branches that reflected the geographical distribution of the species, and no expansion had occurred. This study revealed a high inter-population differentiation level of *Odontobutis potamophila* and also suggested a high conservation and selective breeding value between each population.

Key words: *Odontobutis potamophila*; different geographic populations; mitochondrial genes; population genetic analyses

河川沙塘鳢 (*Odontobutis potamophila*) 隶属鲈形目 (Perciformes)、沙塘鳢科 (Odontobutidae)、沙塘鳢属 (*Odontobutis*), 主要分布于长江中下游、钱塘江水系、闽江水系, 偶见于黄河水系^[1], 是一种营养价值高、味道鲜美的优质鱼类, 且具有一定的保健作用。

由于河川沙塘鳢个体较小, 且喜食活的小鱼小虾, 养殖难度大, 其养殖仍以套养为主^[2], 产量相

对较低。近年来, 随着市场需求的日益增加, 养殖群体已供不应求。在价格攀升的驱使下, 渔民的捕捞热情空前高涨, 河川沙塘鳢的野生资源急剧衰退, 在 2017 年的 IUCN 红色名录中, 被评级为信息缺乏 (Data Deficient, DD) 的物种^[3]。在此背景下, 开展河川沙塘鳢的群体遗传分析工作, 不仅可以指导地方良种的选育, 也有利于野生资源的保护。

安徽是河川沙塘鳢的主要分布地, 为探究其境

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 安徽省农业科学院学科建设项目 (17A0513), 国家虾蟹产业技术体系 (CARS-48), 安徽省水产产业技术体系 (2016-84) 和特色水产动物种质创制与利用创新团队 (2019YL026) 共同资助。

作者简介: 张 焯, 博士, 助理研究员。E-mail: zhangye890204@163.com

* 通信作者: 凌 俊, 副研究员。E-mail: fisherling@163.com

内长江、新安江两大水系河川沙塘鳢群体遗传变异, 研究分别采集安徽长江、新安江流域的4个地理群体, 共142个河川沙塘鳢样本。由于线粒体基因具有进化速率适宜、低重组率等特点, 常作为分子标记用于水产动物群体遗传分析^[4-5]。因此, 研究基于线粒体基因, 探讨安徽河川沙塘鳢不同地理群体遗传分化水平, 为丰富其群体遗传研究及种质资源保护等提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

样本采集地如图1所示。

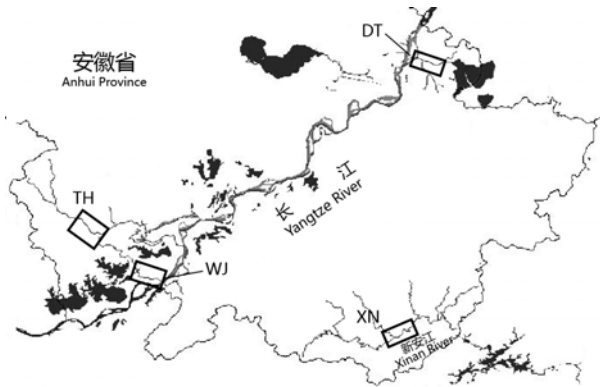


图1 河川沙塘鳢样本采集点

Figure 1 The sampling sites of *Odontobutis potamophila*

1.2 基因组DNA提取

取样本部分尾鳍组织, 采用Sambrook法^[7]提取基因组DNA。

1.3 分子标记的选择与引物设计

登陆GenBank数据库下载河川沙塘鳢线粒体全基因组序列(NC_022706), 挑选扩增产物长度适宜

且信息位点含量高的基因片段作为分子标记。使用Oligo软件设计引物, 引物序列如下: 上游引物STLF: 5'-CTAAAGCCGCAGAATAAGCA-3', 下游引物STLR: 5'-TAGTCATCCTGTTGTTGG-3'。

1.4 基因扩增、克隆及测序

50 μL的PCR反应体系包含200 ng的模板DNA, 5 μL的10×Buffer缓冲液(TaKaRa), 3 μL的dNTP(2.5 mmol·L⁻¹), 4 μL的MgCl₂(2.5 mol·L⁻¹), 上下游引物(5 μmol·L⁻¹)各2 μL, 0.75 U的TaqDNA聚合酶, 无菌超纯水H₂O补齐至50 μL。PCR反应条件如下: 先96℃下预变性1 min, 然后34个循环的94℃下变性45 s, 50~60℃下退火45 s以及72℃下延伸1 min, 最后是72℃下延伸10 min。扩增结束后, 采用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。预期长度的线粒体DNA片段通过DNA纯化试剂盒(DNA Gel Extract Purification Kit, TaKaRa)回收。纯化的PCR产物导入pMD-19T(TaKaRa)载体克隆, 所得菌液委托生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序。

1.5 数据分析

使用DNASTAR软件包^[8]对测序获得的序列片段进行读取和拼接, 并采用MAFFT软件^[9]同源比对, 构建用于下游分析的序列集。利用MEGA软件^[10]分析序列特征(序列长度、碱基组成、多态位点数等)。使用DNAsp软件^[11]计算单倍型数目、单倍型多样性和核苷酸多样性。通过Arlequin软件^[12]计算群体遗传分化指数并进行分子变异分析。使用MrBayes软件^[13], 基于贝叶斯法, 执行3×10⁸代, 构建物种进化树。采用Network软件, 基于中介网络理论, 绘制单倍型网络进化图。

表1 河川沙塘鳢样本采集信息

Table 1 Sampling information of *Odontobutis potamophila*

群体 Populations	样本采集地 Sampling site	所属水系 Streams	采集样本数 Sampling number	经度/E Longitude	纬度/N Latitude
TH	太湖	长江	30	30°23'52"	116°17'60"
WJ	望江	长江	30	30°6'13"	116°38'28"
DT	当涂	长江	28	31°30'32"	118°34'24"
XN	休宁	新安江	54	29°46'50"	118°7'51"

2 结果与分析

2.1 序列特征和遗传多样性分析

测序获得的142条序列已上传至NCBI数据库, 登录号为MH549259 - MH549400。标记全长1291 bp, 包含线粒体DNA轻链蛋白编码基因ND6部分序列(154 bp), *tRNA-Glu*基因序列(68 bp), 基因

间隔区(5 bp)以及重链蛋白编码基因Cyt b部分序列(1064 bp)(图2所示)。序列同源比对后, 共检测到51个简约信息位点, 1个单突变位点, 4种碱基A、T、C和G的平均含量分别是28.7%、25.8%、31.4%和14.1%。WJ和TH群体所有的个体中都在224 bp基因间隔区处检测到了碱基C的插入, 而XN和DT群体中未发现这种插入现象。

异的主要来源, 占总变异比例的 95.31%, 而群体内个体间的变异仅占 4.69%。群体间的遗传分化指数显示 (见表 4), 河川沙塘鳢 4 个群体均处于高度分

化的状态 (F_{st} : 0.823~0.978), 群体间极少有基因交流现象 (N_m : 0.011~0.108)。

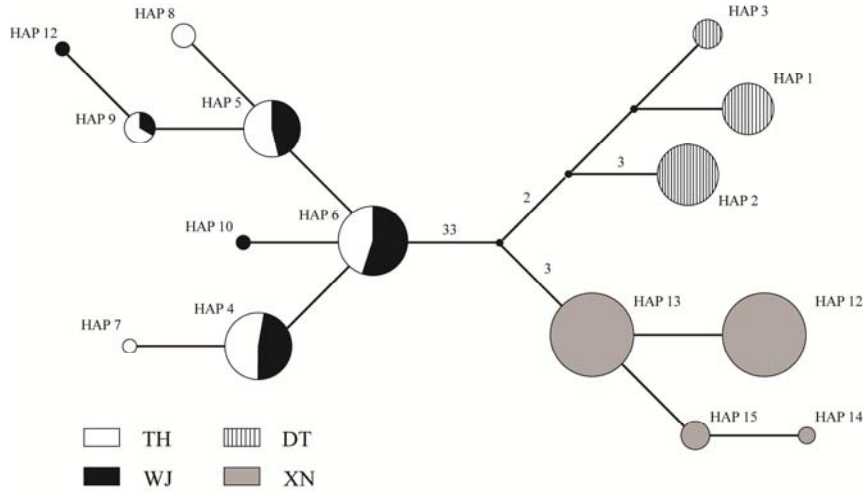


图 4 单倍型中介网络图

Figure 4 Haplotypes network based on MJ method

表 3 河川沙塘鳢 4 个群体分子变异分析

Table 3 AMOVA of 4 populations of *Odontobutis potamophila*

变异来源 Source of variation	自由度 DF	方差组分 SS	变异比例% Percentage of variation	P 值 P value
群体间 Inter-populations	3	1 365.976	95.31	<0.001
群体内 Intra-populations	138	89.609	4.69	<0.001
总变异 Total	141	1 455.585		

表 4 群体间遗传分化指数 (下三角 F_{st}) 和有效迁徙个体数 (上三角 N_m)

Table 4 Pairwise values of F_{st} (below diagonal) and N_m (above diagonal) between populations

Population	DT	WJ	TH	XN
DT		0.026	0.026	0.108
WJ	0.950*		-	0.012
TH	0.951*	-		0.011
XN	0.823*	0.977*	0.978*	

* $P < 0.001$; $N_m = 0.5 \times (1 - F_{st}) / F_{st}$.

Tajima's D 和 Fu's F_s 中性检测^[14-15]分别从群体原始变化和近期扩张事件 2 个角度反映群体的变化。通过中性检测和错配分布分析, 探究河川沙塘鳢的群体动态变化。其中, DT 群体的错配分布分析中, 观测曲线呈现出多峰曲线分布^[16] (如图 5 所示), 与预期恒定群体大小的曲线相背离。结合 Tajima's D 和 Fu's F_s 值为显著正值 (见表 5), 推测 DT 群体经历过收缩。而 XN 和 TH/WJ 群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 值未显著背离 0, 不能排除中性零假说, 且错配分布分析中, 观测曲线呈现单峰的泊松分布, 与假设的恒定群体大小的预期曲线相

吻合。因此, 推测 XN 和 TH/WJ 群体未经受过选择压的调控, 群体大小恒定。4 个群体整体而言, Tajima's D 和 Fu's F_s 值均为显著正值, 错配分布分析中, 观测曲线也呈现出多峰, 与预期曲线相背离, 因此推测河川沙塘鳢 4 个群体整体发生过收缩。

表 5 河川沙塘鳢群体中性检验结果

Table 5 Neutral test of *Odontobutis potamophila* populations

群体 Populations	Tajima's D	Fu's F_s
DT	2.25 ($P < 0.05$)	1.77 ($P < 0.05$)
XN	0.08 ($P > 0.1$)	-0.32 ($P > 0.1$)
TH/WJ	0.24 ($P > 0.1$)	0.95 ($P > 0.1$)
总体 Total	3.52 ($P < 0.001$)	3.20 ($P < 0.02$)

3 讨论

3.1 河川沙塘鳢群体鉴定分子标记的开发

研究选用的分子标记包含线粒体 DNA 轻链蛋白编码基因 *ND6* 部分序列 (154 bp), *tRNA-Glu* 基因序列 (68 bp), 基因间隔区 (5 bp) 以及重链蛋白编码基因 *Cyt b* 部分序列 (1 064 bp)。通过多个群体间的比较分析, 发现该标记共提供 52 个可变信息

位点, 所有的群体形成了 3 个反映物种的地理分布关系的支系, 并且在 WJ 和 TH 群体中检测到了群体特有的 224 bp 基因间隔区处碱基 C 的插入现象。

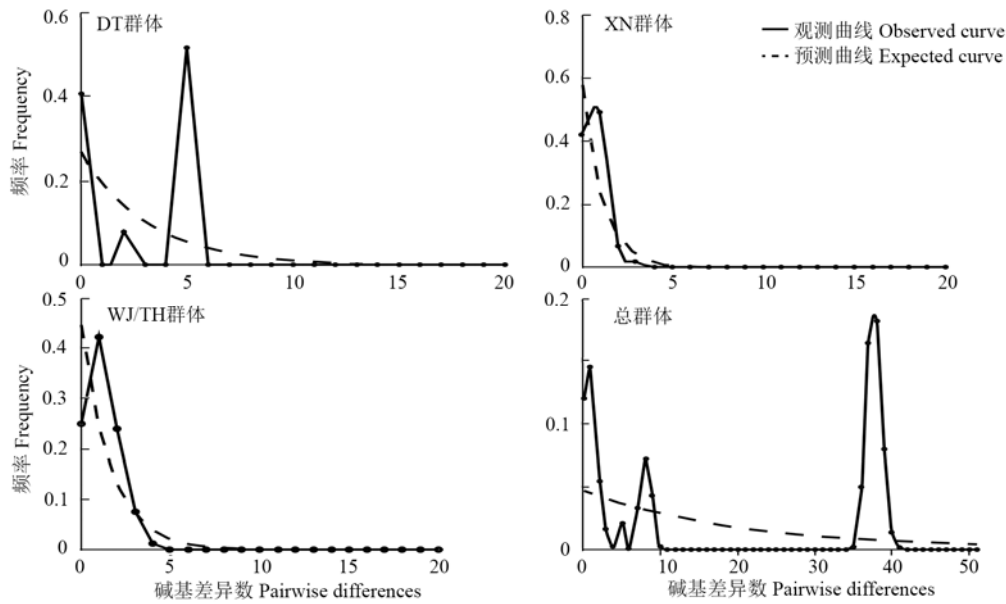


图 5 河川沙塘鳢碱基错配分布

Figure 5 Nucleotide mismatch distribution of *Odontobutis potamophila*

3.2 河川沙塘鳢群体遗传分化和历史动态研究

基于 BI 和 MJ 法构建的系统发生关系中, 河川沙塘鳢 4 个群体形成了 3 个单系支: WJ/TH 支系、DT 支系、XN 支系。个体间的亲缘关系呈现出与样点间地理距离的关联性, 即 WJ 和 TH 群体地理分布较近, 呈现出并系关系, 而与 DT 和 XN 地理距离较远, 呈现出严格的单系关系。3 个支系间未发现共有的祖先单倍型, 说明不同支系起源于不同的祖先个体独立进化形成。此外, Wright^[17]认为如果 2 个群体间的 F_{st} 值大于 0.25, 那么这 2 个群体高度分化。研究中, 4 个群体间, 除 WJ、TH 群体, 其余群体间的 F_{st} 均大于 0.25, 处于高度分化状态, 基本无基因交流现象。不同群体的河川沙塘鳢出现严格的单系性和高度的分化可能与其特有的生活习性息息相关。沙塘鳢为底层鱼类, 生性胆小, 游泳能力较弱, 喜栖息于近岸多水草、瓦砾、石隙和泥沙的底层, 导致群体间的基因交流较少, 产生了群体间的分化。随后的中性检验和核苷酸错配分析表明, 河川沙塘鳢群体并未经历过群体扩张事件, 这也与 Hou 等^[18]的研究结果相一致。

遗传多样性是评价群体生存、适应、进化潜力的重要指标, 也是遗传选育的考量依据。研究中, 河川沙塘鳢 4 个群体内无论是单倍型多样性 (Hd: 0.579~0.763) 还是核苷酸多样性 (Pi: 0.000 53~

因此, 该标记在鉴定不同水系或同一水系不同群体间的河川沙塘鳢个体时能够提供足够的分辨率。

0.002 12) 均处于较低的水平。然而, 4 个群体的总体遗传多样性水平很高 (Hd: 0.880; Pi: 0.015 62)。AMOVA 分析结果表明, 分子水平的变异绝大多数来源于群体间的变异, 仅有小部分来自于群体内个体间的变异。因此, 推测研究中的 4 个河川沙塘鳢群体均是由少量的个体通过不断的群体内繁殖而发展形成的。由于亲代基因型较为单一, 出现了群体内多样性低, 群体间的分子变异高的现象。

群体遗传结构形成的外在影响因素有很多, 如特定环境下的适应性进化^[19]、群居动物中的亲属选择^[20]以及遗传育种中的人工定向选择^[21]。然而隔离是种群分化的必要条件。因此, 河川沙塘鳢出现分化的外在因素是地理分布的隔绝。结合前人的研究结果^[22-23], 河川沙塘鳢群体可能在第四纪冰川期遭受过大规模的灭亡。冰川期, 地表温度低, 河川沙塘鳢群体分布收缩, 仅有少数河川沙塘鳢于冰期避难所中得以存活, 造成了群体间的隔绝。随后, 地表温度回升, 河川沙塘鳢少量个体不断繁衍壮大, 形成群体。由于冰川瓶颈效应的原因, 群体内的遗传多样性水平很低。而遗传漂变的巨大压力导致了不同群体间的基因频率发生了改变, 从而产生了群体间高度分化的现象。

综上所述, 河川沙塘鳢群体间的分化程度很高, 每一个群体都是极其宝贵的基因库, 应得到足够的

重视和保护。此外,河川沙塘鳢群体间的遗传选育意义应高于群体内的选育。

参考文献:

- [1] 张春光, 赵亚辉. 中国内陆鱼类物种与分布[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [2] 黄爱华, 周文军. 青虾塘套养沙塘鳢水花养殖试验[J]. 科学养鱼, 2017(6):29-31.
- [3] OSIPOVA E, SHADIE P, ZWAHLEN C, et al. IUCN World Heritage Outlook 2: A conservation assessment of all natural World Heritage sites. Gland: IUCN, 2017.
- [4] 胡玉婷, 江河, 潘庭双, 等. 安徽淮河水系黄鳢群体遗传多样性及其遗传结构[J]. 安徽农业大学学报, 2016, 43(4):529-535.
- [5] 杨喜书, 章群, 余帆洋, 等. 华南 6 水系与澜沧江-湄公河攀鲈线粒体 ND2 基因的遗传多样性分析[J]. 南方水产科学, 2017, 13(3):43-50.
- [6] 伍汉霖, 吴小清, 解玉浩. 中国沙塘鳢属鱼类的整理和一新种的叙述[J]. 上海水产大学学报, 1993, 2(1): 52-61.
- [7] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Long Island: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] BURLAND T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software[M]// MISENER S, KRAWETZ S A. Bioinformatics methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2000.
- [9] KATO K, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(4): 772-780.
- [10] CUMMINGS M P. MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)[M]// HANCOCK J M, ZVELEBIL M J. Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology. New York: Wiley-Liss Press, 2004.
- [11] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11):1451-1452.
- [12] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinform Online, 2005, 1(4A):47-50.
- [13] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12):1572-1574.
- [14] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123(3):585-595.
- [15] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection[J]. Genetics, 1997, 147(2):915.
- [16] ROGERS A R, HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. Mol Biol Evol, 1992, 9(3):552-569.
- [17] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations. Vol. 1. Genetic and biometric foundations[M]. London and Chicago: University of Chicago Press, 1968.
- [18] HOU X Y, ZHU F, YIN S W, et al. Genetic diversity of *Odontobutis potamophila* from different geographic populations inferred from mtDNA control region[J]. Mitochondrial DNA, 2014, 25(5): 400-406.
- [19] LI R, FAN W, TIAN G, et al. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome[J]. Nature, 2010, 463(7279): 311.
- [20] 曾志将, 颜伟玉. 蜜蜂性比的分子调控机制研究[J]. 经济动物学报, 2004, 8(4):224-226.
- [21] 梁红蕾, 鲍传和, 蒋业林, 等. 中华鳖两个地理种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(1): 31-35.
- [22] 侯新远. 河川沙塘鳢群体遗传多样性及其系统进化研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2014.
- [23] 李强. 基于多基因位点的长江流域及淮河流域沙塘鳢属鱼类遗传多样性与种群遗传结构分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.