

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00483

团头鲂野生、驯养、选育 3 类遗传生态群体遗传变异的线粒体 DNA 分析

唐首杰, 李思发, 蔡完其

上海海洋大学, 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306

摘要: 通过对线粒体 DNA 控制区和 CO I 基因序列的联合分析, 研究了团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) 3 类遗传生态群体(包含 4 个野生群体、2 个驯养群体、1 个选育良种“浦江 1 号”群体)的遗传多样性和遗传分化情况。结果表明: (1)在所分析的 7 个群体中, 共确定了 64 种单倍型, 群体间无共享单倍型。(2) 4 个野生群体内线粒体 DNA 的单倍型多样性(H_d)在 0.857 ~ 0.943 之间, 核苷酸变异位点数在 31 ~ 40 之间, 核苷酸多样性指数(π)在 0.275% ~ 0.461% 之间, 平均核苷酸差异数(K)的范围为 4.043 ~ 6.800; 2 个驯养群体的相应参数变化范围分别为 0.714 ~ 0.800、18 ~ 21、0.122% ~ 0.175%、1.800 ~ 2.586, 均低于野生群体; 选育群体的相应参数分别为 0.843、23、0.193%、2.843, 低于 4 个野生群体, 但高于 2 个驯养群体。以上 4 种多样性参数在 7 个群体中的变化趋势一致。(3) 7 个群体之间的平均遗传距离在 0.000 6 ~ 0.003 5 之间, 遗传分化指数(F_{ST}) 在 0.010 9 ~ 0.133 1 之间。4 个野生群体间 F_{ST} 值差异不显著($P > 0.05$), 而 2 个驯养群体间 F_{ST} 值差异显著($P < 0.05$), 它们与选育群体间的 F_{ST} 值差异也显著($P < 0.05$)。以上结果表明, 生存环境的殊异(敞开的天然水体, 封闭的驯养池塘)和人工选择(严格有序的科学选育)对种群遗传结构影响巨大, 导致鱼类不同遗传生态类型群体间产生遗传变异和遗传分化。

关键词: 团头鲂; 野生群体; 驯养群体; 选育群体; 遗传生态; 线粒体 DNA; 遗传变异

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0483-10

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)俗名武昌鱼, 草食性经济鱼类。20 世纪 60 年代以前, 团头鲂的自然分布范围很狭窄, 局限于长江中游沿江的一些大中型湖泊。后来, 由于人工养殖, 在全国各地许多养殖场形成了繁育群体。由于过度捕捞、水域污染、水利工程建设导致的生境巨变、破碎、隔离及恶化, 团头鲂的天然资源已遭严重破坏并趋衰竭; 另一方面, 人工繁殖技术虽然促进了团头鲂养殖业发展, 但也出现了人工繁殖群体封闭式管理导致的种质退化, 同时许多地方的无序放流, 更导致了天然群体与人工繁殖群体的交叉混杂, 造成了对天然基因库的干扰。本研究

室从 1986 年开始, 以湖北省淤泥湖团头鲂为基础群体, 采用系统选育和生物技术相结合的方法, 经过长达 15 年的 6 代系统选育, 获得了养殖性能优良的团头鲂“浦江 1 号”^[1-2]。该良种的推广和应用, 推动了团头鲂养殖业的健康发展。

种质资源是育种的物质基础, 育种工作突破性的成就, 取决于关键性基因资源的发掘与利用。从保护团头鲂天然种质资源和合理利用选育良种的角度出发, 开展团头鲂遗传资源的调查和研究, 探索从天然群体到遗传改良群体和驯养群体遗传多样性的变化趋势和规律, 对其天然种质资源的保护和良种选育的持续开展有着科学指

收稿日期: 2010-12-06; 修订日期: 2011-01-24.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30630051).

作者简介: 唐首杰(1981-), 男, 博士, 讲师, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究. Tel: 021-61900468; E-mail: tangshoujie@yahoo.com.cn

通信作者: 李思发, 教授, 博士生导师. Tel: 021-61900450; E-mail: sfli@shou.edu.cn

导意义。迄今有关团头鲂遗传多样性的研究报道较少,且主要是利用同工酶、RAPD及mtDNA控制区等遗传标记的研究^[3-8]。鱼类线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)具有分子小、结构简单、母系遗传、进化速度快等特点,特别是mtDNA控制区(D-loop)的进化速率是其他区段的5倍^[9-10],因此它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^[11-13]。

种群遗传结构可反映种群大小、繁育系统、隔离程度和迁徙格局的时空动态,还可揭示选择强度随时空的分布。在自然条件下,天然种群的基因频率的变化就是生物的进化过程^[14],而在人工驯养和选育条件下,人为的有意/无意的干预则加速着基因频率的变化。这种加速的方向和力度如何,尚缺少定性定量的研究。作者认为,对同种生物开展其野生群体、驯养群体(指祖先为野生群体,在苗种场长期人工饲养、人工繁衍的后代)、选育改良群体的种群遗传结构的研究,不但有助于阐明自然条件下生物变异与环境的关系以及物种形成的机理,更可加深对生物进化过程的认识和理解,从而为种质资源的保护及其遗传改良提供理论基础。故选取团头鲂野生群体、驯养群体、选育改良群体的样本,从核外遗传物质的角度,采用线粒体控制区和CO I基因序列的联合分析,来探知这3类遗传生态型群体的遗传多样性的差异与遗传分化。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用团头鲂野生群体、驯养群体、选育群体来源和采样情况如表1所示。每群体各随机采集32尾。个体全长范围在30~40 cm。剪取每尾鱼的尾鳍鳍条,以95%酒精固定。

1.2 基因组DNA的提取

基因组DNA提取采用常规的“酚-氯仿”法^[15]进行。

1.3 线粒体DNA控制区和CO I基因的扩增

1.3.1 扩增和测序反应的引物设计 根据GenBank中已报道的团头鲂的线粒体DNA全序列(登录号NC_010341.1),利用在线引物设计软件Primer3^[16]设计D-loop区和CO I基因的正向和反向引物序列及退火温度(表2)。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3.2 PCR扩增条件 PCR扩增反应体系总体积为50 μL,含5 μL 10×扩增缓冲液,4 μL dNTP混合液(每种dNTP的终浓度0.2 mmol/L),正、反向引物各2 μL(终浓度0.2 μmol/L),2 μL基因组DNA(50~150 ng),1 μL Taq DNA聚合酶(2 U),34 μL无菌重蒸水。反应程序为:94 °C预变性5 min;接下来进行35个循环,每个循环包括94 °C 30 s,56.4 °C(控制区)/49.4 °C(CO I基因)30 s;72 °C 1 min,最后1个循环结束后在72 °C延伸10 min。

1.4 PCR扩增产物的纯化和检测

用购自“天根生化科技(北京)有限公司”的超

表1 团头鲂野生群体、驯养群体、选育群体来源和采样情况

Tab.1 Sampling locality and sampling sizes of wild, domesticated and genetically selected populations of *Megalobrama amblycephala*

遗传生态型 genetic-ecological pattern	群体名称 population name	采集地 locality	样本数 sampling size	代号 code
野生 wild population	梁子湖团头鲂野生群体	湖北鄂州国家级团头鲂原种场	32	LZ
	淤泥湖团头鲂野生群体	湖北公安淤泥湖	32	YN
	石首老河团头鲂野生群体	湖北石首老河四大家鱼原种场	32	SS
	监利老江河团头鲂野生群体	湖北监利老江河四大家鱼原种生态库	32	JL
驯养 domesticated population	换新团头鲂驯养群体	天津换新水产良种场	32	HX
	公安团头鲂驯养群体	湖北公安县淤泥湖渔场	32	GA
选育 genetically selected population	团头鲂“浦江1号”F ₇	上海海洋大学鱼类种质试验站	32	PJ

表 2 团头鲂线粒体 DNA 控制区和 CO I 基因的引物序列和退火温度

Tab.2 Sequence and annealing temperature of control region and CO I gene primers for mitochondrial DNA of *Megalobrama amblycephala*

扩增区段 amplified region	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	片段大小/bp fragment size
控制区 control region	F:ggctcccaaagccagaat R:ttctcagggcccatctaac	56.4	1033
CO I 基因 CO I gene	F:catcccaagcaactaggatt R:gctctagtgggactgcttcg	49.4	646

注: F 表示正向引物; R 表示反向引物。

Note: F denotes forward primer; R denotes reverse primer.

薄 DNA 产物纯化试剂盒(离心柱型)对 PCR 扩增产物进行回收纯化。取 2 μL 纯化产物经 1.5%进口分子生物学级琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)电泳, 电泳缓冲液为 0.5×TBE, 电压为 5 V/cm, 经 2.5 h 后, 用 Gene-Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析。

1.5 DNA 序列测定

纯化后的样品委托上海生工生物工程技术有限公司进行单向测序, 测序引物分别为控制区与 CO I 基因的正向引物(F), 序列测定仪为美国 ABI 公司 377 型全自动序列分析仪。

1.6 数据处理和分析

用 BLAST 软件^[17]搜索 GenBank 中的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*, 登录号 NC_010341.1)的线粒体 DNA 控制区和 CO I 基因序列, 与本实验测得的团头鲂相应序列结果进行同源性比较; 然后用 BioEdit 软件^[18]对测序结果进行编辑, 以 CLUSTL W 软件^[19]进行序列重排和同源比较, 并进行人工核对校正。将控制区与 CO I 基因片段合并在一起, 用 PAUP* 4.0b10 软件^[20]进行控制区和 CO I 基因片段的分区同质性检测(partition homogeneity test)^[21]。用 Arlequin 3.01 软件^[22]估测群体间成对 F_{ST} 值^[23], 并利用排列测验法(permutation test)进行显著性检验(重复次数为 1000); 用 DNAsp 4.10 软件^[24]计算单倍型多样性(haplotype diversity, H_d)^[25]、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, π)^[26]和平均核苷酸差异数(average number of nucleotide differences, K), 序列变异中性检验(neutrality test)用 Tajima^[27-28]的 D 统计检验; 单倍型多样性(H_d)

和核苷酸多样性(π)计算公式如下:

$$H_d = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right); \quad \pi = \frac{n}{L(n-1)} \sum_{j=1}^L \left(1 - \sum_{i=1}^L x_{ij}^2\right)$$

式中, n 为群体样本大小, p_i 为第 i 个单倍型在群体中出现的频率, k 为单倍型数目, x_{ij} 为第 i 个核苷酸(A, G, C 或 T)在序列中的第 j 位点上的频率, L 为序列的长度。

用 MEGA 4.0 软件包^[29]中的 Kimura Two-Parameter 程序^[30]计算群体间核苷酸序列的两两间遗传距离, 用 UPGMA 法和邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建群体间的分子系统树(Kimura Two-Parameter 法估算遗传距离)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

团头鲂野生、驯养以及选育群体的线粒体 DNA 控制区和 CO I 基因片段的 PCR 扩增结果如图 1 和图 2 所示。控制区和 CO I 基因片段的大小分别为 1 000 bp 和 700 bp 左右。

2.2 PCR 产物序列测定及排序结果

PCR 产物经纯化后测序, 各扩增片段经同源重排后的长度(不包括插入/缺失)分别为: 控制区长为 928 bp; CO I 基因片段长为 581 bp。由于任何一段 DNA 序列的变化都无法代表整个生物基因组 DNA 序列的变化, 因此将多个不同的片段序列联合, 才可能比较真实地反映生物类群的遗传多样性信息。本研究用 PAUP*4.0b10 软件^[20]进行控制区和 CO I 基因片段的分区同质性检测(partition homogeneity test)^[21], 结果为 $P > 0.05$, 表

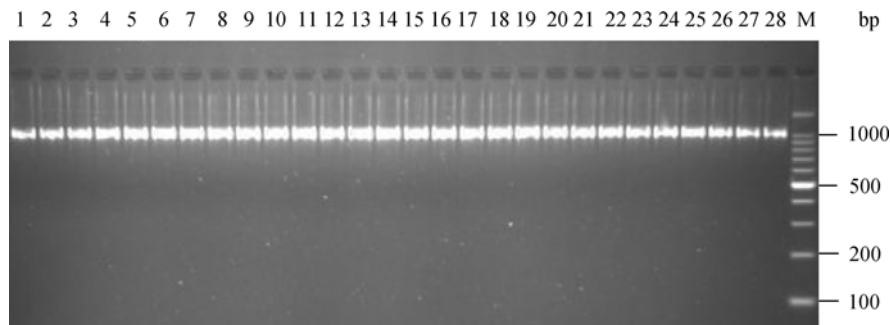


图 1 团头鲂各群体线粒体 DNA 控制区的 PCR 扩增结果

1-4: LZ; 5-8: YN; 9-12: SS; 13-16: JL; 17-20: GA; 21-24: HX; 25-28: PJ. M: 100 bp DNA ladder marker(TAKARA). 各群体代码如表 1 所示.

Fig.1 PCR amplification products of the mitochondrial DNA control region in *Megalobrama amblycephala* populations Lane 1-4: LZ; Lane 5-8: YN; Lane 9-12: SS; Lane 13-16: JL; Lane 17-20: GA; Lane 21-24: HX; Lane 25-28: PJ.M: 100 bp DNA ladder marker(TAKARA). Code for each population is shown in tab.1.

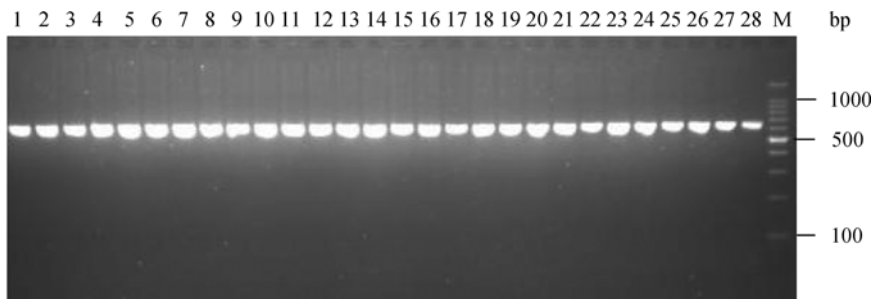


图 2 团头鲂各群体线粒体 DNA CO I 基因片段 PCR 扩增结果

1-4: LZ; 5-8: YN; 9-12: SS; 13-16: JL; 17-20: GA; 21-24: HX; 25-28: PJ. M: 100 bp DNA ladder marker(TAKARA). 各群体代码如表 1 所示.

Fig.2 PCR amplification products of the mitochondrial DNA CO I gene fragment in *Megalobrama amblycephala* populations Lane 1-4: LZ; Lane 5-8: YN; Lane 9-12: SS; Lane 13-16: JL; Lane 17-20: GA; Lane 21-24: HX; Lane 25-28: PJ. M: 100 bp DNA ladder marker(TAKARA). Code for each population is shown in tab.1.

明这 2 个片段可以合并,因此本研究将控制区和 CO I 基因片段合并为 1 条总长度为 1 509 bp(不包括插入/缺失)的片段,以用于群体遗传多样性分析。

2.3 团头鲂野生群体、驯养群体和选育群体的遗传结构

2.3.1 群体内线粒体 DNA 单倍型多样性差异 团头鲂野生、驯养和选育群体内的单倍型多样性见表 3。在所分析的 7 个团头鲂群体共 224 条序列中,确定了 64 种单倍型(haplotype),各群体间无共享单倍型。各群体内单倍型数范围为 6~12,其中梁子湖野生群体(LZ)的单倍型数最多,湖北公安驯养群体(GA)的单倍型数最少。4 个团头鲂野生群体内线粒体 DNA 的单倍型多样性在 0.857~

0.943 之间,其中,梁子湖野生群体(LZ)的单倍型多样性最高;2 个驯养群体单倍型多样性在 0.714~0.800 之间,均低于野生群体;选育群体的单倍型多样性为 0.843,低于 4 个野生群体,但高于 2 个驯养群体。7 个群体中的单倍型多样性由高到低依次为 LZ、SS、JL、YN、PJ、HX、GA。

2.3.2 群体内线粒体 DNA 核苷酸多样性差异 团头鲂野生、驯养和选育群体内线粒体 DNA 的核苷酸多样性如表 4 所示。分析表明,4 个野生群体的核苷酸变异位点数在 31~40 之间,核苷酸多样性指数(π)在 0.275%~0.461%间,平均核苷酸差异数(K)的范围为 4.043~6.800;2 个驯养群体的相应参数变化范围分别为 18~21、0.122%~0.175%、1.800~2.586,均低于野生群体;选育群

表 3 团头鲂野生群体、驯养群体和选育群体内线粒体 DNA 单倍型多样性

Tab. 3 Haplotype diversity (H_a) of mitochondrial DNA in wild, domesticated and genetically selected populations of *Megalobrama amblycephala*

项目 item	群体 population						
	LZ	YN	SS	JL	GA	HX	PJ
样本数 sampling size	32	32	32	32	32	32	32
单倍型数 number of haplotypes(h)	12	9	11	10	6	8	8
单倍型多样性($\bar{x} \pm SD$) haplotype diversity (H_a)	0.943±0.011	0.857±0.041	0.929±0.016	0.900±0.027	0.714±0.067	0.800±0.056	0.843±0.040

注: 各群体代码如表 1 所示.

Note: Code for each population is shown in tab.1.

体的相应参数分别为 23、0.193%、2.843, 低于野生群体, 高于 2 个驯养群体。群体内个体间平均核苷酸差异数和核苷酸多样性均随变异位点数目的增加而增加, 呈正比例关系, 以上 3 个参数在 7 个群体中的变化趋势由大到小依次为 LZ、SS、JL、YN、PJ、HX、GA, 这与前面单倍型多样度的分析结果一致。LZ 群体的变异位点数最多(40 个), 其核苷酸多样性及平均核苷酸差异数也为最高, 分别为 0.461%和 6.800。Tajima's D 中性检验均不显著($P > 0.10$), 符合中性突变。

2.3.3 群体间线粒体 DNA 核苷酸序列的平均遗传距离 团头鲂野生、驯养和选育群体间 Kimura 双参数遗传距离见表 5。从表 5 可以看出, 7 群体之间的平均遗传距离在 0.000 6 ~ 0.003 5 之间, PJ 群体与 JL 群体之间的遗传距离最大(0.003 5), SS 群体与 JL 群体之间的遗传距离最小(0.000 6)。

2.3.4 分子方差分析(AMOVA)结果 对团头鲂野生、驯养和选育群体线粒体基因的核苷酸序列变异进行分子方差分析, 总方差剖分为群体间的方差(V_a)和群体内的方差(V_b), 并进行显著性检验。群体间的方差组分(V_a)占总变异的 11.54%, 群体内的方差组分(V_b)占 88.46%, 7 个群体团头鲂间总的遗传分化指数(F_{ST})为 0.115 35, 差异显著($P < 0.05$, 表 6)。

进一步分析团头鲂野生、驯养和选育群体间的遗传分化, 用 Arlequin 3.01 软件计算 7 个群体间的遗传分化指数(F_{ST})和相应的 P 值(表 5)。7 个团头鲂群体间的遗传分化指数(F_{ST})在 0.010 9 ~ 0.133 1 之间。PJ 群体与 JL 群体之间的遗传分化指数最高($F_{ST} = 0.133 1$), SS 群体与 JL 群体之间的遗传分化指数最低($F_{ST} = 0.010 9$)。从群体之分化的 P 值可以推断, 4 个野生群体间 F_{ST} 值差异不

表 4 团头鲂野生群体、驯养群体和选育群体内线粒体 DNA 的核苷酸多态性

Tab.4 Nucleotide polymorphism of mitochondrial DNA in wild, domesticated and genetically selected populations of *Megalobrama amblycephala*

项目 item	群体 population						
	LZ	YN	SS	JL	GA	HX	PJ
变异位点数 number of variable sites	40	31	36	35	18	21	23
核苷酸多样性指数/% ($\bar{x} \pm SD$) nucleotide diversity(π)	0.461±0.065	0.275±0.031	0.359±0.069	0.352±0.057	0.122±0.025	0.175±0.020	0.193±0.029
平均核苷酸差异数 average number of nucleotide differences(K)	6.800	4.043	5.329	5.171	1.800	2.586	2.843
Tajima's D	-0.41808 ($P > 0.10$)	-0.04571 ($P > 0.10$)	-0.73401 ($P > 0.10$)	-0.08589 ($P > 0.10$)	-0.50961 ($P > 0.10$)	0.57153 ($P > 0.10$)	-0.05535 ($P > 0.10$)

注: 各群体代码如表 1 所示.

Note: Code for each population is shown in tab.1.

表 5 团头鲂野生群体、驯养群体和选育群体间线粒体 DNA 核苷酸序列的平均遗传距离(右上角)和遗传分化指数 (F_{ST})(左下角)

Tab. 5 Average genetic distances(right-upper diagonal) and fixation index (F_{ST}) (left-lower diagonal) from mitochondrial DNA nucleotide sequences among wild, domesticated and genetically selected populations of *Megalobrama amblycephala*

群体 population	LZ	YN	SS	JL	GA	HX	PJ
LZ	-	0.0013 (0.0004)	0.0012 (0.0004)	0.0011 (0.0003)	0.0018 (0.0005)	0.0023 (0.0007)	0.0020 (0.0006)
YN	0.0458 ($P>0.05$)	-	0.0009 (0.0002)	0.0010 (0.0002)	0.0007 (0.0001)	0.0028 (0.0007)	0.0032 (0.0007)
SS	0.0442 ($P>0.05$)	0.0226 ($P>0.05$)	-	0.0006 (0.0001)	0.0016 (0.0004)	0.0024 (0.0007)	0.0034 (0.0007)
JL	0.0374 ($P>0.05$)	0.0322 ($P>0.05$)	0.0109 ($P>0.05$)	-	0.0023 (0.0005)	0.0018 (0.0006)	0.0035 (0.0008)
GA	0.0574 ($P>0.05$)	0.0177 ($P>0.05$)	0.0545 ($P<0.05$)	0.0702 ($P<0.01$)	-	0.0025 (0.0006)	0.0028 (0.0008)
HX	0.0705 ($P<0.05$)	0.0909 ($P<0.05$)	0.0722 ($P<0.01$)	0.0558 ($P<0.05$)	0.0780 ($P<0.01$)	-	0.0014 (0.0005)
PJ	0.0692 ($P<0.01$)	0.1028 ($P<0.01$)	0.1176 ($P<0.01$)	0.1331 ($P<0.01$)	0.1005 ($P<0.01$)	0.0539 ($P<0.05$)	-

注: 括号内数字表示标准误. 各群体代码如表 1 所示.

Note: Numbers in parenthesis present the standard error (SE). Code for each population is shown in tab.1.

表 6 团头鲂野生群体、驯养群体和选育群体间遗传差异的分子方差分析(AMOVA)

Tab.6 Analysis of molecular variance (AMOVA) of wild, domesticated and genetically selected populations of *Megalobrama amblycephala*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance component	方差比例/% percentage of variance
群体间 among populations	6	254.996	1.07135(V_a)	11.54
群体内 within population	217	1782.906	8.21616(V_b)	88.46
总变异 total variation	223	2037.902	9.28750	
遗传分化指数 $F_{ST} = 0.11535$				

注: V_a 为群体间方差组分; V_b 为群体内方差组分.

Note: V_a is variance component among populations; V_b is variance component within population.

显著($P>0.05$), 表明野生群体间不存在显著的遗传分化; 而 2 个驯养群体间 F_{ST} 值差异显著($P<0.05$), 它们与选育群体间的 F_{ST} 值差异也显著($P<0.05$), 表明驯养群体间及其与选育群体间发生了显著的遗传分化; 除公安驯养群体(GA)与淤泥湖野生群体(YN)间 F_{ST} 值差异不显著外, 其余野生群体与驯养群体及选育群体间成对 F_{ST} 值差异显著($P<0.05$).

2.4 聚类分析结果

通过 MEGA 3.0 软件, 根据 Kimura 双参数模型计算出团头鲂野生、驯养和选育群体间的遗传距离(表 5), 用 UPGMA 法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means)构建的 7 个团头鲂群体的分子系统树如图 3 所示。聚类结果显示, 7 群体团头鲂明显分成两大支。4 个野生群体与公

安驯养群体聚为一个支, “浦江 1 号” F_7 群体与换新驯养群体(HX)聚为另一支。值得注意的是, 公

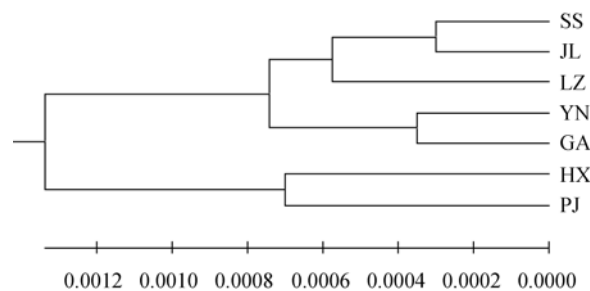


图 3 基于线粒体 DNA 核苷酸序列的平均遗传距离构建的团头鲂野生群体、驯养群体和选育群体间的 UPGMA 聚类关系

各群体代码如表 1 所示.

Fig.3 UPGMA dendrograms of wild, domesticated and genetically selected populations of *Megalobrama amblycephala* based on the average genetic distances from nucleotide sequences of mitochondrial DNA

Code for each population is shown in tab.1.

安驯养群体(GA)首先与淤泥湖野生群体聚类,然后再与其他3个野生群体聚类,说明公安驯养群体与淤泥湖野生群体间可能存在一定程度的遗传混杂。

3 讨论

3.1 团头鲂野生、驯养和选育3个遗传生态型群体mtDNA遗传多样性的变化

单倍型多样性(H_d)值和核苷酸多样性(π)值是衡量1个群体mtDNA变异程度的2个主要指标。 H_d 是指样本中随机抽取到2个不同单倍型的频率; π 值是指某一群体内一组DNA序列的单位位点的核苷酸差异或替代的平均数。 H_d 值和 π 值越小,群体的多态程度越低,遗传多样性越贫乏。

本研究从线粒体DNA控制区和CO I基因片段联合的1509 bp片段出发,获得了团头鲂野生、驯养及选育共7个群体内的变异位点数(18~40)、单倍型多样性(H_d , 0.714~0.943)、核苷酸多样性指数(π , 0.122%~0.461%)、平均核苷酸差异数(K , 1.800~6.800)以及核苷酸序列间平均遗传距离(0.0012~0.0046),以上所有遗传多样性参数在群体间的变化趋势一致,即从高到低依次为:LZ、SS、JL、YN、PJ、HX、GA。很显然,4个野生群体的遗传多样性参数明显高于驯养群体和选育群体,选育群体的遗传多样性虽低于野生群体,但高于2个驯养群体。野生群体之所以保持较高的遗传多样性水平,最可能的原因就是由于各野生群体因长期未受到较强烈的人工选择的影响,而依然保持着部分原有的古老基因型所致。

团头鲂驯养群体线粒体DNA遗传多样性的显著降低,已在多种鱼类中有过报道^[31-32]。与野生群体相比,遗传多样性降低已经成为鱼类养殖群体的遗传特征。中国人工养殖团头鲂的育苗过程中,为了降低生产成本,往往只选用几十尾团头鲂作为育苗亲本,其中雄、雌性个体比例一般为1.2:1。由于亲鱼选用数量少及性别比例不均衡,使得团头鲂养殖群体更易发生瓶颈效应和近交衰退,从而加速种质的同质化,降低群体的遗传多样性。Vespoor^[33]和Winans^[34]认为,当群体有效

亲本数量小于100时,会降低该群体的遗传多样性;Li等^[35]认为养殖群体繁殖亲本数太少易导致遗传漂变加剧。遗传漂变往往伴随着瓶颈效应,从遗传学的角度来讲,瓶颈效应的发生首先表现为稀有单倍型的消失,随着瓶颈效应的加剧就会表现出单倍型多样性的降低,继而会造成物种生长速度和抗病力的下降^[36]。

在本研究中,团头鲂选育群体的遗传多样性虽低于4个野生群体,但仍然高于2个驯养群体,这意味着团头鲂“浦江1号”虽已经历连续7代和近20年的系统选育,其群体中仍保持了一定水平的遗传多样性,这与团头鲂的科学选育措施是密不可分的^[2]。也从另一个角度说明团头鲂“浦江1号”良种仍有进一步选育的潜力。

另外,在4个野生团头鲂群体中,梁子湖群体的遗传变异水平最高,淤泥湖群体最低,这与李弘华^[8]利用线粒体DNA控制区序列分析获得的结果类似。究其原因,可能与梁子湖国家级团头鲂原种场采取的种质保护措施密不可分。中国已在团头鲂原产地之一的湖北省鄂州市梁子湖建立了国家级团头鲂原种场及相应的种质资源保护区,该种质资源保护区位于梁子湖(2.8万 hm^2)以北,在芦子径与磨刀矶之间,湖面用双层网栈围栏,面积333.3 hm^2 ,对保护团头鲂原种起到了积极的作用。

3.2 团头鲂野生、驯养和选育3个遗传生态型群体间的遗传分化

分化是种群偏离共同祖先所经历的进化过程,反映了种群间遗传差异的大小和距离的远近。分化是遗传变异的结果,遗传变异是分化的物质基础,环境为种群分化提供了特定场所,自然选择使分化得以实现,从而使种群中不同基因携带者对后代基因库作出不同的贡献。大量研究表明,即使在同一地区的不同生境中,种群间也存在遗传分化。广布种内的遗传分化是有规律的而非特殊例外,只要存在选择压力,种群间就会发生分化^[37]。Nevo等^[38]、Bruederle等^[39]分别以大麦和蝴蝶为材料,研究了自然选择对种群分化的效应。

本研究中,4个野生群体间 F_{ST} 值在0.0109~

0.045 8 间, 差异不显著($P>0.05$), 表明 4 个野生群体间不存在显著的遗传分化, 这可能是由于梁子湖、淤泥湖、石首老河故道和监利老江河故道两两之间相距较近(直线距离不超过 200 km), 且 20 世纪 70 年代前都与长江通联, 群体间可能存在着一定程度的基因交流; 此外, 因团头鲂是仅狭窄地自然分布于长江中游一些湖泊中的鱼类, 不排除本研究所采集不同野生群体发源于同一种群的可能性。

2 个团头鲂驯养群体间的 F_{ST} 值差异显著, 表明驯养群体间存在着显著遗传分化。该结果可能与 3 个方面的因素有关: (1)育苗过程中有效亲本数量较少, 加剧了群体遗传漂移的影响, 从而使群体间产生了不同程度的遗传分化, 类似的现象在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[32]和美洲鲑(*Salmo clarki*)^[36]中也有报道; (2)在养殖环境下, 人为和环境的选择会通过改变养殖群体中等位基因构成, 从而影响遗传结构^[40]; (3)育苗过程中人工选择对种质的干预也会改变养殖群体遗传组成。

公安驯养群体与淤泥湖野生群体间 F_{ST} 值差异不显著, 未见两群体间有何显著遗传分化。可能是公安县淤泥湖渔场与淤泥湖天然水面毗邻, 养殖户经常在无意间把人工养殖的个体投放到天然水域, 而野生的个体也很可能被养殖户用作繁殖的亲鱼, 导致野生群体与驯养群体间产生混杂和基因交流。

参考文献:

- [1] 李思发, 蔡完其. 团头鲂双向选育效应研究[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 201–205.
- [2] Li S F, Cai W Q. Genetic improvement of the herbivorous blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. NAGA, 2003, 26 (1): 20–23.
- [3] 李思发, 蔡完其, 周碧云. 团头鲂种群间的形态差异和生化遗传差异[J]. 水产学报, 1991, 15(3): 204–211.
- [4] 李思发, 杨学明. 双向选择对团头鲂生化遗传变异的影响[J]. 中国水产科学, 1996, 3(1): 1–5.
- [5] 李思发, 杨怀宇, 邹曙明. 快速近交对团头鲂遗传结构的影响和近交效应的估算[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 161–165.
- [6] 张德春. 淤泥湖和梁子湖团头鲂遗传多样性的研究[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2001, 23(3): 282–284.
- [7] 边春媛, 董仕, 谭书贞. 3 个群体团头鲂 mtDNA D-loop 区段的限制性片段长度多态性分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(3): 175–179.
- [8] 李弘华. 淤泥湖、梁子湖、鄱阳湖团头鲂 mtDNA 序列变异及遗传结构分析[J]. 淡水渔业, 2008, 38(4): 63–65.
- [9] Cann R L, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA[J]. Genetics, 1984, 106: 1479–1499.
- [10] Rosel P E, Haygood M G, Perrin W F. Phylogenetic relationship among the true porpoise(Cetacean: Phocoenidae)[J]. Mol Phyl Evol, 1995, 4(4): 463–474.
- [11] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei:Perciformes:Gobioidei) [J]. Mol Phyl Evol, 2003, 26(3): 354–368.
- [12] Grunwald C, Stabile J, Waldman J R, et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences[J]. Mol Ecol, 2002, 11(10): 1885–1898.
- [13] Jose A, Carmona J D, Ignacio D. Congruence between allozyme and cytochrome b gene sequence data in assessing genetic differentiation within the Iberian endemic *Chondrostoma lemmingii* (Pisces: Cypinidae)[J]. Heredity, 2000, 84: 721–732.
- [14] 郭平仲. 群体遗传学导论[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 1–20.
- [15] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual. [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] Rozen S, Skaletsky H J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[M]//Krawetz S, Misener S. Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press, 2000: 365–386.
- [17] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [18] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT[J]. Nucl Acid Symp Ser, 1998, 41: 95–98.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucl Acids Res, 1994,

- 22: 4673–4680.
- [20] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4.0b10[Z]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- [21] Farris J S, Källersjö M, Kluge A G, et al. Testing significance of incongruence[J]. *Cladistics*, 1995, 10: 315–319.
- [22] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis[Z]. *Evol Bioinform Online*, 2005, 1: 47–50.
- [23] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies[J]. *Genetics*, 1995, 139: 457–462.
- [24] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2496–2497.
- [25] Nei M, Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases[J]. *Genetics*, 1981, 97: 145–163.
- [26] Nei M. *Molecular evolutionary genetics*[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [27] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123: 585–589.
- [28] Tajima F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites[J]. *Genetics*, 1996, 143: 1457–1465.
- [29] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599.
- [30] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence[J]. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111–120.
- [31] Iguchi K, Watanabe K, Nishida M. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations[J]. *Aquaculture*, 1999, 178: 235–243.
- [32] Sekino M, Hara M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2002, 213 : 101–122.
- [33] Vespoor E. Reduced genetic variability in first generation hatchery populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1988, 45: 1686–1690.
- [34] Winans G A. Genetic variability in Chinook salmon stocks from the Columbia river basin [J]. *North Am J Fish Management*, 1989, 1: 47–52.
- [35] Li Q, Park C, Endo T, et al. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 235: 207–222.
- [36] Allendorf F W, Phelps S R. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout [J]. *Trans Am Fish Society*, 1980, 109 : 537–543.
- [37] 何维明, 钟章成. 生态遗传学透视[J]. *生态学杂志*, 1997, 16(2): 53–57.
- [38] Nevo E, Belles A, Kaplan D, et al. Natural selection of allozyme polymorphisms: a microsite test revealing ecological genetical differentiation in wild barley[J]. *Evolution*, 1986, 40(1):13–20.
- [39] Bruederle L P, Vorsa N. Genetic differentiation of diploid blueberry. *Vaccinium* sect. *Cyanococcus*(Ericaceae)[J]. *Syst Bot*, 1994, 19(3): 337–349.
- [40] Eknath A E , Doyle R W. Indirect selection for growth and life-history traits in Indian carp aquaculture I. Effects of broodstock management [J]. *Aquaculture*, 1985, 49: 73–84.

Mitochondrial DNA analysis on genetic variation of wild, domesticated, and genetically selected populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

TANG Shoujie, LI Sifa, CAI Wanqi

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Genetic diversity and genetic differentiation of three genetic-ecological populations [“Pujiang No.1” selected strain F₇(PJ), two domesticated populations(HX, GA) as well as four wild populations(LZ, YN, SS, JL)] of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) were analyzed by using combined nucleotide sequences of control region and CO I gene of mitochondrial DNA (mtDNA). The results showed that: (1) Sixty-four haplotypes were defined in analyzed seven populations, in which no haplotype was shared among populations. (2) The haplotype diversity(H_d), number of variable sites, nucleotide diversity(π) and average number of nucleotide differences(K) were 0.857–0.943, 31–40, 0.275%–0.461% and 4.043–6.800, respectively in four wild populations. The four corresponding parameters were 0.714–0.800, 18–21, 0.122%–0.175% and 1.800–2.586, respectively in two domesticated populations, which were lower than those in the four wild populations. Likewise, those parameters were 0.843, 23, 0.193% and 2.843, respectively in genetically selected strain F₇, which were lower than those in the four wild populations but higher than those in two domesticated populations. The above four genetic diversity parameters showed the same trend of change among seven populations. (3) For the seven populations studied, average genetic distance between populations ranged from 0.000 6 to 0.003 5. The pairwise F_{ST} value between populations ranged from 0.010 9 to 0.133 1. For pairwise F_{ST} value between populations, P value of permutation test were significant($P < 0.05$) between GA, HX and PJ populations, but no significant P value($P > 0.05$) were detected between four wild populations. The results indicated that distinct living environments (natural waters and closed fishponds) and artificial selection (strictly and orderly scientific breeding) had a strong impact on the population genetic structure, making difference in genetic variability and genetic differentiation between different types of genetic-ecological populations.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; wild population; domesticated population; genetically selected population; genetic-ecological; mitochondrial DNA; genetic variation

Corresponding author: LI Sifa. Tel: 021-61900450; E-mail: sfli@shou.edu.cn