

Comparison of Mitochondrial D-Loop and Cyt b Sequences of *Ctenopharyngodon idellus*

Weijun Wu, Min Peng, Dapeng Wang, Jun Shi, Yusen Li, Yaoquan Han, Jianjun Lei, Anyou He*

Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Guangxi Institute of Fisheries, Nanning Guangxi
Email: wwj918@126.com, *heanyou2000@aliyun.com

Received: Dec. 2nd, 2015; accepted: Dec. 16th, 2015; published: Dec. 24th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Sequences of mitochondrial D-loop and Cyt b gene of 24 individuals of *Ctenopharyngodon idellus* which were sampled from three populations in Hongshui River were determined. Using PCR amplification and sequencing, 846 bp of D-loop partial sequences and 1083 bp of Cyt b partial sequences were obtained. In D-loop sequences, a total of 10 polymorphic sites were defined; 9 distinct haplotypes, 4 transitions, and 6 insert/lacuna loci were found. In Cyt b sequences, 9 polymorphic sites and 9 haplotypes were defined; 1 transition and 8 insert/lacuna loci were found. Two-sequence analysis showed that, within groups and between groups, the genetic distance is small, and the genetic variation of molecular variation level is not significant. Upper, middle and lower reaches are shared haplotypes, and the genetic differentiation among three populations is little.

Keywords

Ctenopharyngodon idellus, Hongshui River, D-Loop, Cyt b, Genetic Diversity

红水河草鱼线粒体D-Loop和Cyt b基因序列的对比分析

吴伟军, 彭敏, 王大鹏, 施军, 李育森, 韩耀全, 雷建军, 何安尤*

*通讯作者。

文章引用: 吴伟军, 彭敏, 王大鹏, 施军, 李育森, 韩耀全, 雷建军, 何安尤. 红水河草鱼线粒体 D-Loop 和 Cyt b 基因序列的对比分析[J]. 水产研究, 2015, 2(4): 43-49. <http://dx.doi.org/10.12677/ojfr.2015.24005>

广西水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁
Email: wwj918@126.com, heanyou2000@aliyun.com

收稿日期: 2015年12月2日; 录用日期: 2015年12月16日; 发布日期: 2015年12月24日

摘要

研究了红水河野生草鱼*Ctenopharyngodon idellus*上游、中游和下游3个群体29个个体的线粒体控制区(D-loop)和细胞色素b(Cyt b)基因序列, 通过PCR扩增与测序, 分别获得了长度为846 bp和1083 bp的D-loop和Cyt b基因片段。分析表明, D-loop序列共定义了9个单倍型, 存在10个多态位点, 发生转换4次, 插入/缺失6次。Cyt b序列共定义了9个单倍型, 存在9个多态性位点, 发生转换1次, 插入/缺失8次。两序列分析结果表明, 群体间和群体内遗传距离较小, 遗传变异的分子变异等级不显著。上、中、下游均有共享单倍型, 3个群体间遗传分化不大。

关键词

草鱼, 红水河, D-Loop, Cyt b, 遗传变异

1. 引言

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科草鱼属。广西俗称鲢鱼, 体长而扁圆, 背部茶黄色, 腹部呈银白色, 无须、眼较小, 天然生长的最大个体可达 50 kg 以上, 池塘养殖亦可达 10~15 kg, 主食水生和陆生植物, 尤以禾本科植物为多, 兼食昆虫等动物性食料, 常游弋在水的中上层觅食。

线粒体DNA控制区(control region, CR), 又称D-环区(displacement loop region, D-loop), 是线粒体DNA中的一段非编码区, 位于 tRNA Pro 和 tRNA Phe 基因之间, 分为 3 个区段: 终止序列区、中央保守区和保守序列区, 是线粒体 DNA 序列和长度变异最大的区域, 也是线粒体基因中进化最快的部分, 适用于种群水平差异的检测和种间分析[1]。细胞色素 b 基因(Cytochrome b gene, Cyt b)是线粒体 DNA 上的蛋白质编码基因, 其进化速度适中, 适于种群水平差异的检测和种内群体遗传分化程度标记[2]。长江流域已开展的四大家鱼线粒体 DNA 研究较多, 对不同江段的四大家鱼遗传多样性进行了对比分析, 可见报道的有长江中下游四大家鱼线粒体 DNA 多样性的分析[3], 长江中游汉江和湘江水系鲢和草鱼群体的 mtDNA 遗传变异对比分析[4], 赣州江段四大家鱼遗传多样性分析等[5]。本文作者在红水河流域选择 3 个被水利工程相互分隔的区域, 对四大家鱼进行了遗传多样性状况和群体遗传结构调查, 为红水河流域物种的多样性保护提供数据支持。在本文中主要论述草鱼的遗传多样性分析结果。

2. 材料与方法

2.1. 材料

采集 3 个草鱼群体共 29 条, 分别为上游岩滩水库群体(shang)、中游百龙滩水库群体(zhong)和下游来宾市区江段群体(xia), 三个群体采样区域有大坝分隔, 大坝无过鱼设施, 可认为群体间无遗传交流。每尾个体取 0.1 g 背部肌肉新鲜样品, 于无水乙醇中保存。

2.2. 测序方法

通过液氮研磨、裂解液裂解、有机溶剂抽提, 使进入水相的蛋白质与核酸分层, 在 RNA 酶的作用下,

降解 RNA, 得纯度较高的 DNA 样品并进行 PCR 测序。D-loop [3] 和 Cyt b [6] 引物序列同有关文献报道。反应总体积 50 μL , 其中 $10 \times \text{Taq Buffer}$ 5 μL , Taq Polymer-ase 0.5 μL ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), dNTPs ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 μL , Mg^{2+} ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 μL , 引物 1 和 2 ($10 \text{ umol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 μL , 模板 DNA 50 ng, 无离子超纯水 35.5 μL 。经 94°C 预变性 2 min 后, 再进行 35 个循环, 每一循环包括: 94°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min; 最后 72°C 延伸 7 min。每次 PCR 反应均设空白对照。扩增产物经 1.5% TBE 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 紫外灯光下检测、拍照。

2.3. 分析方法

测序获得序列经 SeqMan II 软件拼接并人工校对后, 用 CLUSTAL-X 程序比对[7], DAMBE 软件统计单倍型并作图, 检测转换、颠换是否达饱和。单倍型多样性(Haplotype diversity, H)和核苷酸多样性(Nucleotide diversity, π)由 ARLEQUIN 统计软件计算[8], 分化指数(F-statistics, F_{st}) [9]计算使用 ARLEQUIN, 群体间的基因流由公式 $N_m = [(1/F_{st}) - 1]/2$ [10]计算得出, 群体遗传变异的分子方差分析(AMOVA) [11]在 ARLEQUIN 中完成。用 MEGA4.1 软件统计 DNA 序列的碱基组成[12], 转换/颠换、插入/缺失位点数, 单突变位点, 简约信息位点; 利用 Kimura 双参数模型计算个体间、群体内和群体间的遗传变异率; 用 NJ 法进行聚类分析, 构建聚类关系树。利用 Network4610 软件构建单倍型网络关系图。

3. 结果

3.1. D-Loop 和 Cyt b 基因序列信息

由表 1 可见, 在 29 个 846 bp 的 D-loop 基因序列中共检测出 9 个单倍型。检测到 2 个单突变位点, 8 个简约信息位点数; 在 10 个突变位点中: 转换位点 4 个, 颠换位点 0 个, 插入/缺失位点 6 个, 转换高于颠换。基因片段中, A + T 的含量(66.3%)明显高于 C + G 的含量(33.7%)。24 个 1083 bp 的 Cyt b 基因序列中共检测出 9 个单倍型, 检测到 6 个单突变位点, 3 个简约信息位点; 在 9 个突变位点中: 转换位点 1 个, 颠换位点 0 个, 插入/缺失位点 8 个, A + T 的含量(58.2%)高于 C + G 的含量(41.8%)。对比分析可知: Cyt b 单突变位点百分比为 0.55%, 大于 D-loop 的 0.24%, 而多态位点百分比和简约信息位点百分比分别为 0.83% 和 0.28%, 小于 D-loop 的 1.18% 和 0.94%。

3.2. D-Loop 和 Cyt b 基因序列的遗传变异分析

由表 2 可见, D-loop 序列中, 红水河 3 个草鱼群体内的遗传距离分别为 0.0046、0.0050 和 0.0056。上游群体与中游群体间遗传距离为 0.0042, 上游群体与下游群体间遗传距离为 0.0041, 中游群体和下游群体间遗传距离为 0.0040。Cytb 基因序列中, 群体内的遗传距离分别为 0.0013、0.0020、0.0006。上游群体与中游群体间遗传距离为 0.0015, 上游群体与下游群体间遗传距离为 0.0009, 中游群体和下游群体间遗传距离为 0.0012。群体间遗传距离和群体内遗传距离接近。D-loop 序列得到的遗传距离高于 Cytb 基因序列得出的遗传距离。

3 个群体的 D-loop 和 Cyt b 序列的单倍型多样性 H、平均核苷酸变异数 K、和核苷酸多样性 π 见表 3, 下游群体的 Cyt b 序列 H 值较低, k 值和 π 值也低于其他群体的 Cyt b 序列分析结果。值得注意的是, 上游采集到的样本较多, D-loop 和 Cyt b 序列得到的单倍型数也相同, 均为 7 个单倍型, 而中游和下游样本较少, 单倍型数则有所不同。

群体间的群体间的 F_{st} 和 N_m 值见表 4, 群体间的遗传变异的分子变异等级分析(AMOVA)见表 5, 从分析结果可见, 3 个群体间 D-loop 和 Cyt b 序列遗传差异不显著($F_{st} = -0.14867$ 或 -0.10346 , $p > 0.05$)。

Table 1. Composition and variability of the analyzed mtDNA of *C. idellus*

表 1. 草鱼线粒体 D-loop 及 cyt b 碱基组成及变异分析

基因序列	单倍型	比对碱基位点数	多态位点数 (比例/%)	简约信息位点数(比例/%)	单突变位点数 (比例/%)	转换、颠换数	A + T/%	C + G/%
D-loop	9	846	10 (1.18%)	8 (0.94%)	2 (0.24%)	4/0	66.3%	33.7%
Cyt b	9	1083	9 (0.83%)	3 (0.28%)	6 (0.55%)	1/0	58.2%	41.8%

Table 2. The intrapopulation, interpopulation and overall mean genetic distances of *C. idellus* in Hongshui River based on D-loop and Cyt b gene

表 2. 红水河草鱼 D-loop 和 Cyt b 基因序列群体内和群体间遗传距离

遗传距离	上游(Shang)	中游(Zhong)	下游(Xia)
上游 (Shang)	0.0046		
	0.0013		
中游 (Zhong)	0.0042	0.0050	
	0.0015	0.0020	
下游 (Xia)	0.0041	0.0040	0.0056
	0.0009	0.0012	0.0006

注：上面的代表 D-loop，下面的代表 Cyt b (下同)。

Table 3. Indexes of genetic diversity in the 3 populations of *C. idellus*

表 3. 3 个草鱼群体相关遗传多样性指标

群体	样本数	多态位点	单倍型数	单倍型多样性 H	平均核苷酸变异数 K	核苷酸多样性 π
上游 (Shang)	17	10	7	0.831	3.324	0.00397
	21	7	7	0.752	1.419	0.00131
中游 (Zhong)	5	8	4	0.900	3.600	0.00430
	5	5	5	1.000	2.200	0.00203
下游 (Xia)	3	7	3	1.000	4.000	0.00477
	3	1	2	0.667	0.667	0.00062

Table 4. Three population pairwise F_{st} and N_m values

表 4. 3 个草鱼群体间的 F_{st} 和 N_m

	上游(Shang)	中游(Zhong)	下游(Xia)
上游(Shang)		-2.8830	-1.4186
		-4.2842	-1.8067
中游(Zhong)	-0.0950		-1.1675
	-0.0620		-1.4767
下游(Xia)	-0.2139	-0.2725	
	-0.1606	-0.2038	

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) of 3 populations
表 5. 3 个草鱼群体间的遗传变异的分子变异等级分析(AMOVA)

变异来源	自由度 d.f	平方和	方差组分	变异百分率	F 统计量	P 值
群体间	2	1.482	-0.43958 Va	-14.87	-0.14867	0.95015
	2	0.605	-0.06944 Va	-10.35	-0.10346	0.94526
群体内	22	74.718	3.39626 Vb	114.87		
	26	19.257	0.74066 Vb	110.35		
总体	24	76.200	2.95667			
	28	19.862				

3.3. 分子系统树

以草鱼 D-loop 和 Cyt b 基因序列为外群, 用 NJ 法构建分子系统树, 其拓扑结构见图 1。可见, 3 个群体的个体混杂在一起, 群体间未表现出聚类关系。

4. 讨论

单倍型多样性(H)、平均核苷酸差异数(K)和核苷酸多样性(π)是反映物种遗传变异水平的 3 个重要参数, 本文的分析结果表明红水河 3 草鱼个群体的遗传多样性差别不大, 群体间遗传距离较小, 遗传变异的分子变异等级分析结果为不显著。29 个样本分属 9 个单倍型, 上、中、下游均有共享单倍型, NJ 系统树也显示 3 个群体并未聚集为独立的分支。由于线粒体 DNA 为母系遗传, 一般不发生重组, 表明 3 个群体间遗传分化不大。本文作者对红水河鲢群体进行的研究与此有相似之处, 即总体上群体间遗传分化均较小, 但也有一些不同之处, 鲢群体内两序列遗传距离均表现为上游高于中游, 中游高于下游, 而草鱼的两序列遗传距离表现不同, D-loop 序列遗传距离为下游最高, Cyt b 序列则为下游最低。

红水河综合利用规划实施后, 红水河流域形成了 9 个首尾衔接的梯级水库, 流水生境绝大部分已经萎缩, 天然河道和库区流水江段大为缩短, 产漂流性卵的鱼类需要流速 0.2 m/s 以上, 在库区已不具备形成自然种群条件, 笔者在红水河上游龙滩坝下调查时, 禁渔期前, 也即 3 月底采集到的四大家鱼均已性成熟, 但在 6 月采集到的四大家鱼则可发现卵因无法产出而退化的现象。近十年来, 针对产漂流性卵鱼类资源下降的问题, 各地政府大力开展了增殖放流活动, 由于其他土著性鱼类人工繁育技术成熟度相对较低, 苗种获得不易, 四大家鱼的放流数量占了各地放流比例的 90% 以上。但在调查中, 除上游采集野生四大家鱼较为容易, 样本获得量相对较多外, 中游和下游都很难采集到草鱼样本, 鲢在中游尚可, 下游同样难以采集样本, 可见, 野生群体的资源量仍然偏低。

本文调查的草鱼 3 个群体间遗传分化不大, 可能有两种可能, 第一种可能是水库建成时为三十年以内, 原本连通的群体分隔后尚未产生显著遗传分化。第二种可能, 则是各地增殖放流的草鱼来源接近, 流域原有的群体因繁殖环境丧失, 已经完全被放流群体取代。由于缺乏红水河流域梯级开发前, 草鱼的遗传多样性分析数据, 笔者所在的研究团队拟开展红水河流域草鱼捕捞群体和各地放流群体间的遗传多样性对比分析, 以明确红水河草鱼遗传多样性特征的形成机理。

5. 总结

对红水河上游、中游和下游 3 个野生草鱼群体的 29 个个体的 D-loop 和 Cyt b 基因序列分析表明, D-loop 序列和 Cyt b 序列均定义 9 个单倍型, D-loop 序列存在 10 个多态位点, 而 Cyt b 序列为 9 个。群

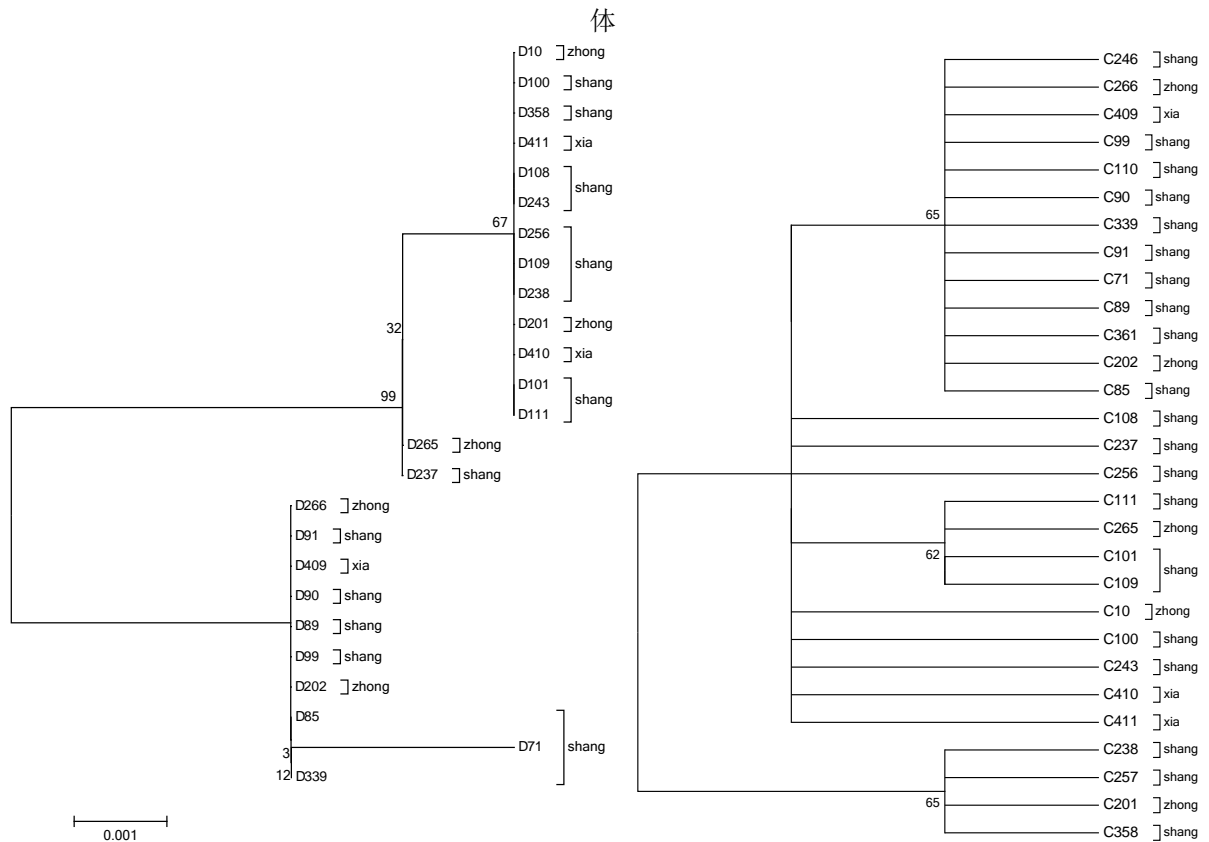


Figure 1. The molecular phylogenetic tree of *C. idellus* in Hongshui River by NJ method based on D-loop (left) and Cyt b (right)

图 1. 红水河 3 个草鱼群体 D-loop (左)和 Cyt b (右)基因序列的 NJ 分子系统树

间和群体内遗传距离较小，遗传变异的分子变异等级不显著。上、中、下游均有共享单倍型，3 个群体间遗传分化不大。需进一步对草鱼放流群体的遗传多样性进行调查分析，以明确群体间遗传分化不大的具体原因。

基金项目

社会公益研究项目(CXIF-2014-006)；自治区直属公益性科研院所基本科研业务专项资金项目(编号：GXIF-2014-006)。

参考文献 (References)

- [1] Lee, W.J. and Kocher, T.D. (1996) Complete Sequence of a Sea Lamprey (*Petromyzoa marinus*) Mitochondrial Genome: Early Establishment of the Vertebrate Genome Organization. *Genetics*, **139**, 873-887.
- [2] Xiao, W.H., Zhang, Y.P. and Liu, H.Z. (2001) Molecular Systematics of Xenocyprinae (Telestei: Cyprinidae): Taxonomy, Biogeography, and Evolution of a Special Group Restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 163-173. <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2000.0879>
- [3] 李思发, 吕国庆, Louis, B., 等. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.
- [4] 张四明, 汪登, 强邓怀, 等. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 142-147.
- [5] 朱日财. 赣江赣州江段四大家鱼生物学特性及其遗传多样性的研究[D]: [硕士学位论文]. 江西: 南昌大学, 2010:

23-40.

- [6] 唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 等. 沙鳅亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 645-653.
- [7] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., *et al.* (1997) The Clustal_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequences Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- [8] Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000) Arlequin, Version 2000: A Software for Population Genetics Data Analysis. University of Geneva, Geneva.
- [9] Wright, S. (1965) The Interpretation of Population Structure by F₂ Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, **19**, 395-420. <http://dx.doi.org/10.2307/2406450>
- [10] Nei, M. (1982) Evolution of Human Races at the Gene Level. In: Bonne, T.B., Cohen, T., Goodman, R.M., *et al.*, Eds., *Human Genetics, Part A: The Unfolding Genome*, Alan R Liss, New York, 167-181.
- [11] Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quatfro, J.M. (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Heliotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, **131**, 479-497.
- [12] Kumar, S., Tamura, K., Jakobseni, B., *et al.* (2001) MEGA2.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe.