

野生大鲵及其人工繁殖后代的遗传多样性分析

方耀林¹ 张 燕¹ 肖汉兵^{1,2} 杨焱清¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 荆州 434000;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF WILD CHINESE GIANT SALAMANDER (ANDRIA DAVIDIANUS) AND THEIR ARTIFICIALLY PROPAGATED PROGENIES

FANG Yao-Lin¹, ZHANG Yan¹, XIAO Han-Bing^{1,2} and YANG Yan-Qing¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology of Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries

Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000; 2. Freshwater Fisheries Research Center

Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

关键词: 大鲵; mtDNA控制区; 遗传多样性

Key words: Chinese giant salamander; Control region of mtDNA; Genetic diversity

中图分类号: Q348 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)05-0783-04

中国大鲵 (*Andrias davidianus*), 俗称“娃娃鱼”, 隶属两栖纲 *Amphibia* 有尾目 *Caudata* 隐鳃鲵科 *Cryptobranchidae* 大鲵属 *Andrias*^[1]。大鲵是我国特有的珍稀野生动物, 是现存的两栖动物中最大的一种。近几十年来, 随着人口的膨胀及人类开发自然资源强度的增强, 大鲵赖以生存的环境受到严重破坏, 种群数量减少, 种群内年龄结构趋向小型化。特别是由于大鲵有很高的经济价值, 人为的捕杀导致了它的天然资源严重衰竭。随着大鲵人工繁殖及规模化繁育技术的成功, 我国大鲵人工繁殖种群的数量在逐年增长, 开展大鲵保护遗传学的研究, 对大鲵的人工增殖和种质资源管理有重要的意义。

动物线粒体 DNA(mtDNA)呈母系遗传, 无重组, 且碱基替换速率快, 比核基因有更高的变异, 是保护生物学和进化生物学研究中的重要手段之一。特别是 mtDNA控制区(D-loop)为整个线粒体基因组序列和长度变异最大的区域, 是种群遗传多样性研究中十分有效的分子标记, 近年来被广泛用于许多物种的遗传管理、濒危物种的保护、种群结构和进化史等方面的研究^[2-4]。本研究通过对大鲵野生种群和养殖种群的 mtDNA控制区序列的比较分析, 探讨大鲵的增殖管理及遗传保护问题, 为大鲵的种群复壮和种质资源的合理开发利用提供一些有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 材料 试验样本分别来源于长江水产研究所和浙江金华大鲵繁育基地驯养的野生大鲵(文中简称为自然群体或亲本)及其人工繁殖的子一代(文中简称为养殖群体)。两个基地的自然种群均来源于长江中上游及汉水流域。其中长江水产研究所驯养野生大鲵(代号 *cdy*)19尾, 繁殖子代(代号 *cdz*)21尾, 金华大鲵繁育基地驯养的野生大鲵(代号 *jdy*)18尾, 繁殖子代(代号 *jdz*)35尾。每尾样取小量肌肉放于 95%乙醇保存, 带回实验室备用。

1.2 基因组 DNA提取 用生理盐水或 STE缓冲液浸泡洗组织去除乙醇后, 剪碎, 加 0.5 mL STE、蛋白酶 K(10mg/mL)15 μ L和 SDS(10%)40 μ L于 50 $^{\circ}$ C水浴 4~6h 按常规酚抽法提取基因组 DNA^[5]。

1.3 mtDNA控制区扩增及测序 大鲵 mtDNA控制区 PCR引物根据控制区两端的 tRNA基因序列设计, 引物序列为: tRNA^{Pro}: 5'-CTGGCCTCCAAAGCCAGAATTC-3', tRNA^{Phe}: 5'-ATC-TATCTAGGCATTTC-3' AGTGC-3'。

PCR反应体系为: Taq DNA聚合酶 2U 10 \times Buffer 5 μ L 10 mmol/L dNTP 0.4 μ L 10 μ mol/L 引物各 2 μ L 模板 DNA 1 μ L 加无菌去离子水至 50 μ L PCR反应共设 30个

收稿日期: 2006-08-28 修订日期: 2007-05-16

基金项目: 中国水产科学研究院基金(2003-3-6); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术实验室第五期开放课题资助

作者简介: 方耀林(1962-), 女, 浙江慈溪人; 副研究员; 主要从事淡水鱼类种质资源与生物技术研究。E-mail: fy13004@yahoo.com 本研究得到汪登强博士的帮助, 在此表示感谢

通讯作者: 肖汉兵, Tel 0716-8126596 E-mail: xhb@yfi.ac.cn

循环,每一循环包括 94℃ 45s 56℃ 30s 72℃ 90s 开始循环前在 94℃预先变性 3min 循环结束后 72℃再延伸 5min

PCR反应结束后,取 2 μ L反应液在 0.8%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)中电泳检测扩增效果,将扩增效果好的样品用 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,再用 Gel Extraction Kit纯化回收。回收的 PCR产物直接用于测序。

1.4 数据分析 用软件包 DNA Star辅助人工校对 DNA序列,序列的比对用 ClustalX 1.83完成。用核苷酸多样性指数(π)和单倍型多样性(h)两个参数评估种群的遗传变异,由 DnaSP4.1软件完成。用 MEGA v3.0计算种群间基于 Kimura-2参数的距离遗传(D)。种群间的遗传分化用分子变异分析(AMOVA)评价,由 Arlequin 2.0软件计算完成。

表 1 大鲵各单倍型多态性位点分布
Tab. 1 Polymorphic sites in different haplotypes of Chinese Giant Salamander

单倍型 Haplotype	DNA序列 DNA sequence	分布 Distribution			
		α y	α z	jly	jtz
	3 5 2 3 3 3 3 4 4 4 5 6 6 6 6 6 7 7 7 7 7				
	7 3 5 2 2 2 2 3 6 9 9 3 3 4 5 6 7 9 0 1 3 4 4				
	4 2 4 5 7 6 8 0 4 5 9 1 1 7 2 3 1 1 9 0 4				
Hap1	C T T C T T A T G T C C A A C A A T G T A G—	5	9	2	5
Hap2 G —	6	5	8	22
Hap3 G . . G —	2			
Hap4 G A —	1			
Hap5 G . C —	1			
Hap6 G G —	1			
Hap7	. . A G —	1	2	4	5
Hap8	. . A G . . . A —			1	
Hap9	. . A T . . . C —		2		
Hap10	. . A G A —				1
Hap11 G A —				1
Hap12	T . . . G . G . A G C . —			1	1
Hap13	T . . . G . G . . G C . —	1			
Hap14	T C . . G G G G —	1			
Hap15	T C . . G G G . . . T A . . . T . . . C . A A	2	1	2	

2.2 自然群体和养殖群体的遗传多样性

样本的遗传多样性通过单倍型多样性(h)以及核苷酸多样性(π)衡量(表 2)。其中长江所基地驯养的自然群体 π 值和 h 值最高,金华基地的繁殖子代 π 值和 h 值最低。

2.3 自然群体和养殖群体间的遗传距离

两组亲本与子代的遗传距离和遗传分化指数的结果(表 3)。亲本与各自子代之间的遗传相遗传距离分别为 0.0041和 0.0032 由基因频率计算出两个亲本与各自子代之间的遗传分化指数(F_{st})分别为 0.01552和 0.04419。所有群体的遗传分化指数 F_{st} 为 0.05454

2 结 果

2.1 控制区序列及其差异

经比对后,获得 mtDNA控制区长度为 757bp A、T、C、G 平均分别占 31.7%、33.1%、20.9%、14.3%,G 所占比例最少。G+C 含量 35.2%,低于 A+T(64.8%)含量,与脊椎动物 mtDNA碱基组成相似^[9]。93个样本共检测到多态性核苷酸变异位点 23个(表 1),占全部碱基数的 3.04%。除第 744位为碱基插入/缺失外,其余序列变异均为两个碱基之间的转换或颠换,转换/颠换比为 2:0。 比对 93 尾大鲵线粒体 DNA 控制区序列共产生 15 种单倍型,单倍型的序列差异在 0.13%—1.74%之间,平均 0.68%。各单倍型在两个自然群体及其自子代之间的分布有一些不同,只有 Hap1、Hap2、Hap7 是 4 个群体共享的单倍型(表 1)。

表 2 大鲵单倍型多样性(h)及核苷酸多样性(π)

Tab. 2 Haplotype (h) and nucleotide diversities (π) of Chinese Giant Salamander

	α y	α z	jly	jtz
单倍型数 The numbers of haplotype	8	7	6	6
单倍型多样性 h Haplotype diversity h	0.842	0.771	0.765	0.578
核苷酸多样性 π Nucleotide diversity π	0.00496	0.00310	0.00482	0.00138

表 3 大鲵各群体间的遗传分化指数 Fst(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Tab 3 Genetic differentiation indices Fst (above the diagonal) and genetic distances (below the diagonal) among different populations of Chinese giant salamander				
	长江所亲本 cdy	长江所子代 cdz	金华亲本 jdy	金华子代 jdz
长江所亲本 cdy		—0.00327	0.00285	0.07141
长江所子代 cdz	0.00413		0.06340	0.13637
金华亲本 jdy	0.00480	0.00405		0.00399
金华子代 jdz	0.00342	0.00242	0.00318	

3 讨 论

大鲵是非常古老的物种, 主要分布在长江中上游、珠江中上游及汉水上游深山峡谷溪流中, 是一种处于水生到陆生之间的过渡物种, 进化上十分原始。近几十年来, 随着人口的膨胀及人类开发自然资源强度的增强, 栖息地的破坏和丧失非常明显, 大鲵天然种群数量急剧减少, 现在它已被国家列为二级保护动物。遗传多样性保护是濒危动物保护的重要内容之一, 目前有关大鲵遗传背景的研究还刚刚起步。已有的文献中, Murphy et al 对线粒体 Cytb 和 ATP6 基因的序列分析和陶峰勇等对中国大鲵四种群的遗传结构和地理分化的研究均显示大鲵的遗传多样性较贫乏^[7, 8]。本研究中两个大鲵繁育基地大鲵自然群体的核苷酸多样性指数都很低, 与前人的研究结果一致。两个大鲵繁育基地的亲本都来自长江上游及汉水流域的自然群体, 只是采样时间前后相差约 8—10 年, 结果中长江所基地亲本的单倍型多样性 (h) 以及核苷酸多样性 (π) 略高于金华基地的亲本, 两群体间的遗传距离为 0.00480 Fst 值为 0.00285 尚未达到种群分化标准^[9, 10]。实验中两组亲本与子代之间单倍型的分布有一些不同, 一些亲本中检测到的单倍型在子代中没有, 个别子代中出现的单倍型与亲本不一致, 这可能与采样有关。另外, 从结果中可以看出两组亲本的单倍型多样性 (h) 及核苷酸多样性 (π) 均略高于各自的子代, 表明人工繁殖子代的遗传多样性有所下降。需要说明的是本次实验采样的两个基地已形成规模化繁育, 大鲵野生亲本的量均达数百尾, 每年繁殖大鲵子代数万尾, 因此, 在大鲵饲养种群的数量增加的同时如何保护好大鲵的遗传多样性, 仍是大鲵合理开发及其资源保护的一个重要课题。

群体的遗传变异水平是评估生物资源状况的一个重要参数, 它与生物的抗病力、生长速度和个体大小等生物学性状紧密相关。检测群体的遗传变异水平, 尤其是比较自然群体与养殖群体各遗传参数的差异情况, 对了解人工繁殖对大鲵基因库的影响程度以及种质复壮工作意义重大。实验中两组的亲本与各自子代之间的遗传相似度和遗传距离, 远低于 Shaklee et al 提出的鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离 D 值分别为 0.90、0.30 及 0.05 的分类依据^[9], 两组的亲本与各自子代之间的 Fst 值也低于 0.05 没有形成明显遗传分化^[10]。本研究的两个养殖群体是来源于野生群体

的第一代, 尽管群体遗传分化还不显著, 但表 3 中可以看出两个子代种群的 Fst 值最大 (0.13637), 说明不同大鲵人工繁殖的后代, 遗传分化有扩大的趋势^[11, 12]; 另外, 在未来养殖过程中, 由于累代人工繁殖, 仍可能造成一定程度近交和纯合化。因此, 为了防止人工繁殖中近交衰退的问题, 除了尽量保持繁殖亲本达到足够大, 还应注意对繁育群体的遗传多样性的检测分析, 最大限度地减少遗传随机漂变, 保留群体的遗传多样性。另外鉴于目前进行大鲵人工繁殖的单位中, 能形成规模化繁育的单位屈指可数, 在这种情况下, 对大鲵人工繁殖群体的放流应持谨慎态度。

参考文献:

[1] China Wildlife Conservation Association Fei Liang Atlas of amphibians of china[M] . Zhengzhou : Henan Science and Technology Press 1999 38—40 [中国野生动物保护协会, 费梁. 中国两栖动物图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社. 1999 38—40]

[2] Zhu Z Y Yue G H. The complete mitochondrial genome of red grouper *Plectropomus leopardus* and its applications in identification of grouper species[J] . Aquaculture 2008 276: 44—49

[3] Thuy T T N Brett I Stephen S et al Mitochondrial DNA diversity of broodstock of two indigenous mahseer species *Tor tambroides* and *T. douronensis* (Cyprinidae) cultured in Sarawak Malaysia [J] . Aquaculture 2006 253: 259—269

[4] Wang J B Hu C L Xu H F. Applications of mitochondrial DNA variability analysis in zoological conservation biology[J] . Biodiversity Science 2001 9(2): 181—187

[5] Wang Y Q Wang X G Xu L X et al A new rapid method for extraction of high quality of genomic DNA from animal tissues [J] . J of Zoology 2001 36(1): 27—29 [汪永庆, 王新国, 徐来祥, 等. 一组动物基因组 DNA 提取方法的改进. 动物学杂志, 2001 36(1): 27—29]

[6] Broughton R E Milan H E Roe B A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J] . Genome Research 2001 11(11): 1958—1967

[7] Murphyc R W Fu J Z Upton D E et al Genetic variability among endangered Chinese Giant Salamander *Andrias davidianus* [J] . Molecular Ecology 2000 9: 1539—1547

[8] Tao F Y Wang X M Zheng H X et al Genetic structure and

geographic subdivision of four populations of the Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) [J]. *Zoological Research* 2005 **26**(2): 162—167 [陶峰勇, 王小明, 郑合勋, 等. 中国大鲵四种群的遗传结构和地理分化. *动物学研究*, 2005 **26**(2): 162—167]

[9] Shaklee JB. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoresis analysis of proteins [J]. *Pac Sci* 1982 **36**: 141—157

[10] Wright S. Evolution and the genetics of population variability with and among natural population [M]. Chicago: University of Chicago Press 1978

[11] Schneider S, Rossio D, Excoffier L. Arlequin ver 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland 2000

[12] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics* 2004 **5**: 150—163