

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2014.02.014

· 研究简报 ·

内蒙古达里湖及岗更湖东北雅罗鱼 D-loop 基因序列及多样性研究

罗旭光, 齐景伟, 安晓萍, 乌兰, 姚 璐, 李 蓓

(内蒙古农业大学动物科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 文章对内蒙古达里湖和岗更湖东北雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii* Dybowski) 的 mtDNA D-loop 序列进行扩增, 获得了 896 bp 的同源基因序列, 得到的同源基因片段中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量, 达里湖群体为 32.0%、32.2%、21.3% 和 14.5%; 岗更湖群体为 32.0%、32.2%、21.4% 和 14.5%; 达里湖和岗更湖鱼群 D-loop 基因 CG 含量相当, 未见明显差异。2 个群体内和群体间都存在丰富的序列多态性, 两湖群体的 D-loop 基因 896 个位点中存在可变位点 33 个, 其余位点较为保守; 达里湖 30 尾鱼 D-loop 基因含有多态性位点/突变位点 21 个, 11 个单倍型; 岗更湖 30 尾鱼 D-loop 基因含有多态性位点/突变位点 31 个, 17 个单倍型; 岗更湖鱼群 D-loop 基因多样性高于达里湖。遗传距离计算显示, 岗更湖和达里湖鱼群之间的平均遗传距离为 0.007 0; 达里湖鱼群之间的平均遗传距离为 0.003 6; 岗更湖鱼群之间的平均遗传距离为 0.007 4。岗更湖鱼群 D-loop 基因的平均遗传距离大于达里湖鱼, 前者群体 D-loop 基因进化速度大于后者。

关键词: 东北雅罗鱼; 内蒙古; D-loop 基因; 多样性; 遗传距离

中图分类号: S 917

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)02-0092-05

D-loop gene sequence and diversity of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Dali Lake and Ganggeng Lake in Inner Mongolia

LUO Xuguang, QI Jingwei, AN Xiaoping, WU Lan, YAO Jun, LI Bei

(College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: We amplified the mtDNA D-loop sequence in two stocks of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Dali Lake and Ganggeng Lake in Inner Mongolia, having obtained 896 bp gene sequences; the average contents of T, C, A and G of homological fragments were 32.0%, 32.2%, 21.3%, 14.5% and 32.0%, 32.2%, 21.4%, 14.5% in Dali Lake stock and Ganggeng Lake stock, respectively, with no significant difference. The inter- and intra-population of the two stocks had high degree of sequence polymorphism. There were 33 variable sites in 896 D-loop gene loci in the two stocks, and the rest sites were more conservative. The D-loop genes of 30 fish in Dali Lake contained 21 polymorphisms/mutations and 11 haplotypes; while those in Ganggeng Lake contained 31 polymorphisms/mutations and 17 haplotypes. The diversity of D-loop gene in Ganggeng Lake stock was higher than that in Dali Lake stock. Genetic distance calculation shows that the average genetic distance between Ganggeng Lake and Dali Lake stocks was 0.007 0 (Dali Lake: 0.003 6, Ganggeng Lake: 0.007 4). The genetic distance of the D-loop gene in Ganggeng Lake stock was greater than that in Dali Lake stock, and the evolution speed of the former was faster than that of the latter.

Key words: *Leuciscus waleckii* Dybowski; Inner Mongolia; D-loop gene; diversity; genetic distance

东北雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii* Dybowski) 亦称瓦氏雅罗鱼, 隶属鲤形目、鲤科、雅罗鱼亚科的雅罗鱼属, 主要分

收稿日期: 2013-09-27; 修回日期: 2013-12-02

资助项目: 内蒙古自然科学基金项目(2010MS0313)

作者简介: 罗旭光(1966-), 男, 硕士, 副教授, 从事水产动物养殖及遗传育种研究。E-mail: luoxuguang899@163.com

布于中国东北的黑龙江和辽河流域各水系及黄河下游、滦河等。在内蒙古除额济纳河水系以外的海拉河、岱海、达里湖、呼伦湖、乌梁素海等各大水域均有分布,是内蒙古地区的重要小型经济鱼类。内蒙古地区野生东北雅罗鱼是在该地区不同水系中经过长期自然选择而形成的适合当地恶劣的环境条件的“土著”鱼类,该物种对当地的生态环境具有极强的适应性,保持着耐低温、耐盐碱、适应性强的特点,具有一定的种群特异性。尤其是生活在内蒙古达里湖的东北雅罗鱼,可耐受碱度 $53.57 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 高达 9.69 的恶劣水域条件^[1]。内蒙古各大中水面盐碱度高,东北雅罗鱼是开发和利用这些水体资源非常合适的品种,具有较大的开发和推广价值。20 世纪 80 年代以前东北雅罗鱼在内蒙古各大中水面分布很广,90 年代后由于水域生态环境的变化及过度捕捞,种群数量逐年减少,个体规格也在逐年减小,种质资源逐渐衰退,甚至在内蒙古的一些水面相继消失。

动物线粒体 DNA 的进化速度快,具有高度多态且无组织特异性,已被广泛应用于动物种群的进化研究和遗传多样性分析中^[2]。其中 D-loop 区是线粒体中变异最大、进化最快的区域,具有较高的突变积累,比较适用于种内、种群或个体间遗传多样性的研究^[3]。许多学者运用线粒体控制区技术研究了鱼类^[4-6]、贝类^[7]、虾类^[8]、蟹类^[9]、鳖^[10]等种内或种群间的遗传结构和遗传分化。有关东北雅罗鱼的分子遗传的研究报道较少,刘金亮等^[11-12]和池炳杰等^[13]分别进行了东北雅罗鱼微卫星分子标记的筛选和瓦氏雅罗鱼(*L. walechii*)达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析,但对东北雅罗鱼的线粒体 DNA 遗传的研究还未见报道。文章对内蒙古地区东北雅罗鱼的线粒体 DNA 控制区的序列进行了测定,初步研究了达里湖和岗更湖东北雅罗鱼群体的遗传多样性和遗传分化,为该鱼的种质资源保护及选育积累相关材料,也为丰富中国淡水渔业资源提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验所用东北雅罗鱼 60 尾,其中取自于内蒙古达里湖 30 例,岗更湖 30 例,另外的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 9 例,来自于呼和浩特市东瓦窑农贸市场;取鱼肌肉,于 95% 的乙醇 -20 °C 保存备用。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和鉴定 将 95% 乙醇保存的标本取出,置于无菌蒸馏水中浸泡 3 h 以上,去除干净乙醇;用组织匀浆仪将组织打碎,取约 100 μg 匀浆后的组织,采用 promega Wizard Genomic DNA Purification Kit 试剂盒提取基因组 DNA。提取的基因组 DNA 用微量紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 的吸光度以及 DNA 的质量浓度。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和纯度。

1.2.2 引物设计 根据黄志坚等^[14-15]方法设计扩增 D-loop 区域的兼并引物,序列如下:

MitDI-F: CACCCYTRRCTCCCAAAGCYA;

MitDI-R: GGTGCGGRKACTTGCATGTRTAA

1.2.3 PCR 扩增和序列测定 基因扩增使用 Takara Premix PrimeSTAR HS,反应总体积 50 μL 包括:PCR Premix 25 μL ,上下游引物各 2 μL ,模板 1 μL ,补足灭菌水至 50 μL 。PCR 反应条件如下:95 °C 预变性 5 min,然后重复 25 个循环包括 95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 20 s,最后 72 °C 延伸 7 min。产物用 8% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下将扩增良好的条带进行切胶回收,用天根 DP209-03 柱式胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物送至吉美公司进行测序。

1.2.4 数据处理 测定的 DNA 序列进行人工校正,采用 DNAMAN (V 5.2.2) 软件进行个体和各鱼群间的序列比对,分析基因序列的核苷酸碱基的组成、位点变异;用 MEGA (V 5.1) 软件进行系统进化树、遗传距离、GC 含量等分析。利用 DANsp V5 软件分析基因多态性及单倍型。

2 结果与分析

2.1 扩 增 结 果

根据引物的位置,计算出不同基因片段 PCR 产物的长度。对 2 个湖东北雅罗鱼群体的 60 尾鱼线粒体 D-loop 基因进行了序列测定,得到的 D-loop 基因约 1 kb 的基因序列,扩增的部分结果见图 1。

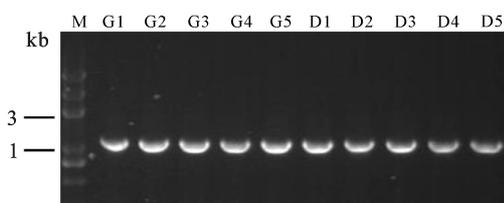


图 1 D-loop 基因 PCR 扩增结果

M. marker; D. 达里湖的样品; G. 岗更湖的样品

Fig. 1 PCR amplified products of D-loop gene

M. marker; D. samples in Dali Lake; G. samples in Ganggeng Lake

2.2 D-loop 基因序列特征分析

2.2.1 GC 含量 1 kb 左右的 mtDNA D-loop PCR 扩增产物的测序结果经过校对和拼接后,同源排序得到 60 尾鱼 896 bp 的同源基因序列。用 DNAMAN、MEGA 分析同源序列,得到 2 个群体鱼同源基因片段中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量是,达里湖鱼群为 32.0%, 32.2%, 21.3% 和 14.5%; 岗更湖为 32.0%, 32.2%, 21.4% 和 14.5%; A + T 平均含量为 64.2%, G + C 平均含量为 35.8%。说明东北雅罗鱼 D-loop 区富含 A + T 碱基,并且达里湖和岗更湖群体 D-loop 基因 GC 含量相当,未见明显差异。

2.2.2 变异 在所分析两湖鱼群的 D-loop 基因 896 个位

点中存在可变位点 33 个, 其余位点较为保守; 达里湖 30 条鱼 D-loop 基因含有多态性位点/突变位点 21 个, 11 个单倍型; 岗更湖 30 条鱼 D-loop 基因含有多态性位点/突变位点 31, 17 个单倍型。说明岗更湖群体 D-loop 基因多样性高于达里湖。

2.3 遗传分化

2.3.1 系统进化 系统进化分析显示草鱼 D-loop 基因单独形成一个分支; 而岗更湖和达里湖鱼群 D-loop 基因同处在一个大的进化分支上, 该大分支又分为 2 个亚分支, 基因 I 群和 II 群; 达里湖和岗更湖两群体的 D-loop 基因没有以湖为单位独立形成自己的进化分支; 基因 I 群和基因 II 群中, 分别含有两湖鱼群的基因。基因进化树见图 2。

两湖样品中的 G7、G8、G9、G12、G13、G21、G25、G31、D2、D4、D5、D6、D7、D11、D13、D14、D15、D17 和 D29 的 D-loop 基因核苷酸同源性明显高于其他样品基因, 对比进化树分析结果显示, 此 19 份样品同处于基因 I 群。进一步确定了此 19 份样品进化地位的相似性; 不同湖鱼群 D-loop 基因存在相同的进化规律。

2.3.2 遗传距离 遗传距离计算结果见表 1, 岗更湖和达里湖鱼群之间的平均遗传距离为 0.007 0; 达里湖鱼群之间的平均遗传距离为 0.003 6; 岗更湖鱼群之间的平均遗传距离为 0.007 4; 草鱼群之间的平均遗传距离为 0.003 6。说明岗更湖群体 D-loop 基因的平均遗传距离大于达里湖鱼, 前者鱼群 D-loop 基因进化速度大于后者。每尾鱼之间的两两遗传距离, 与系统进化树显示结果基本一致。

表 1 达里湖和岗更湖东北雅罗鱼群体之间的遗传距离

Tab. 1 Genetic distance between *L. waleckii* Dybowski stocks in Dali Lake and Ganggeng Lake

	草鱼 <i>C. idellus</i>	达里湖东北雅罗鱼 <i>L. waleckii</i> in Dali Lake	岗更湖东北雅罗鱼 <i>L. waleckii</i> in Ganggeng Lake
草鱼 <i>C. idellus</i>	0.003 6	0.393 0	0.395 0
达里湖东北雅罗鱼 <i>L. waleckii</i> in Dali Lake	0.393 0	0.003 6	0.007 0
岗更湖东北雅罗鱼 <i>L. waleckii</i> in Ganggeng Lake	0.395 0	0.007 0	0.007 4

3 讨论

3.1 东北雅罗鱼 mtDNA D-loop 序列

生物的遗传形状决定于碱基组成和排列顺序, 每一种生物都有稳定的 DNA 碱基组成及排列。在不同的物种中 A + T / C + G 含量不同。笔者对 2 个湖东北雅罗鱼群体的 60 尾鱼线粒体 D-loop 基因进行了序列测定, 扩增产物的测序结果经过校对和拼接后, 同源排序得到 896 bp 的同源基因序列。其中 D-loop 区中的 A + T 碱基含量超过了一半, 占全序列的 64.2%; C + G 含量为 35.8%; A + T 的含量高于 C + G 的含量, 这与其他鱼类 mtDNA D-loop 区中 A 和 T 的含量丰富相一致^[16-17], 与其他脊椎动物中 mtDNA 碱基的 A + T 的含量高于 C + G 含量的组成特点也相符合^[18-19]。

3.2 东北雅罗鱼的多样性

从目前所能利用的鱼类 mtDNA 数据分析表明, 鱼类 mtDNA 变异的主要特征是以碱基替换为主, 插入和缺失较少, 序列进化速率较核 DNA 快 5 ~ 10 倍, 几乎无重组现象。在种内或种间控制区进化速率最快, 具有较高的突变积累而形成多态性, 是进行种内、种群或个体间遗传多样性研究的理想材料, 其分子标记能够有效地检测到传统形态学所无法辨别的种群水平的分化^[20]。笔者研究发现, 达里湖 30 尾鱼 D-loop 基因含有多态性位点/突变位点 21 个, 11 个单倍型; 岗更湖 30 尾鱼 D-loop 基因含有多态性位点/

突变位点 31 个, 17 个单倍型。说明岗更湖群体 D-loop 基因多样性高于达里湖, 这可能与它生活的水环境有关。岗更湖是典型的淡水湖, 水体中食料丰富, 湖区周围水草繁茂, 产卵条件较好; 达里湖属高原内陆湖, 为封闭式苏打型半咸水湖, 酸碱度为 9.4 ~ 9.6, 其盐碱度极高且呈逐年增长趋势, 生态环境不断恶化, 水体食物越来越少等因素导致遗传多样性低的特点。另外, 达里湖雅罗鱼市场需求量大, 每年捕捞量约 500 t, 长期捕捞强度不断加大, 渔业资源不断下降减少^[21]、分布范围限制、繁殖群体的数量减少而导致的近交衰退可能是造成岗更湖群体比达里湖群体的遗传多样性更为丰富的原因之一。池炳杰等^[13]采用微卫星标记分别对达里湖和乌苏里江野生瓦氏雅罗鱼个体进行 STR-PCR 研究得出的结果与笔者研究相似, 即淡水环境群体(乌苏里江)比高盐碱水环境群体(达里湖)的遗传多样性更为丰富。

3.3 遗传分化

达里湖和岗更湖群体 D-loop 基因的进化没有因为不同水域而独立进化, 2 个湖群体 D-loop 基因在同时进化, 且进化方向类似, 同时存在基因 I 群和基因 II 群; 在 2 个群体 60 尾样品中, 岗更湖 8 尾, 达里湖 11 尾同处于基因 I 群, 说明达里湖和岗更湖群体 D-loop 基因存在相同的进化规律。究其原因可能是 2 个湖群地理位置相似, 相似的环境(温度、湿度、气压等)促进了鱼群向相似方向进化。遗

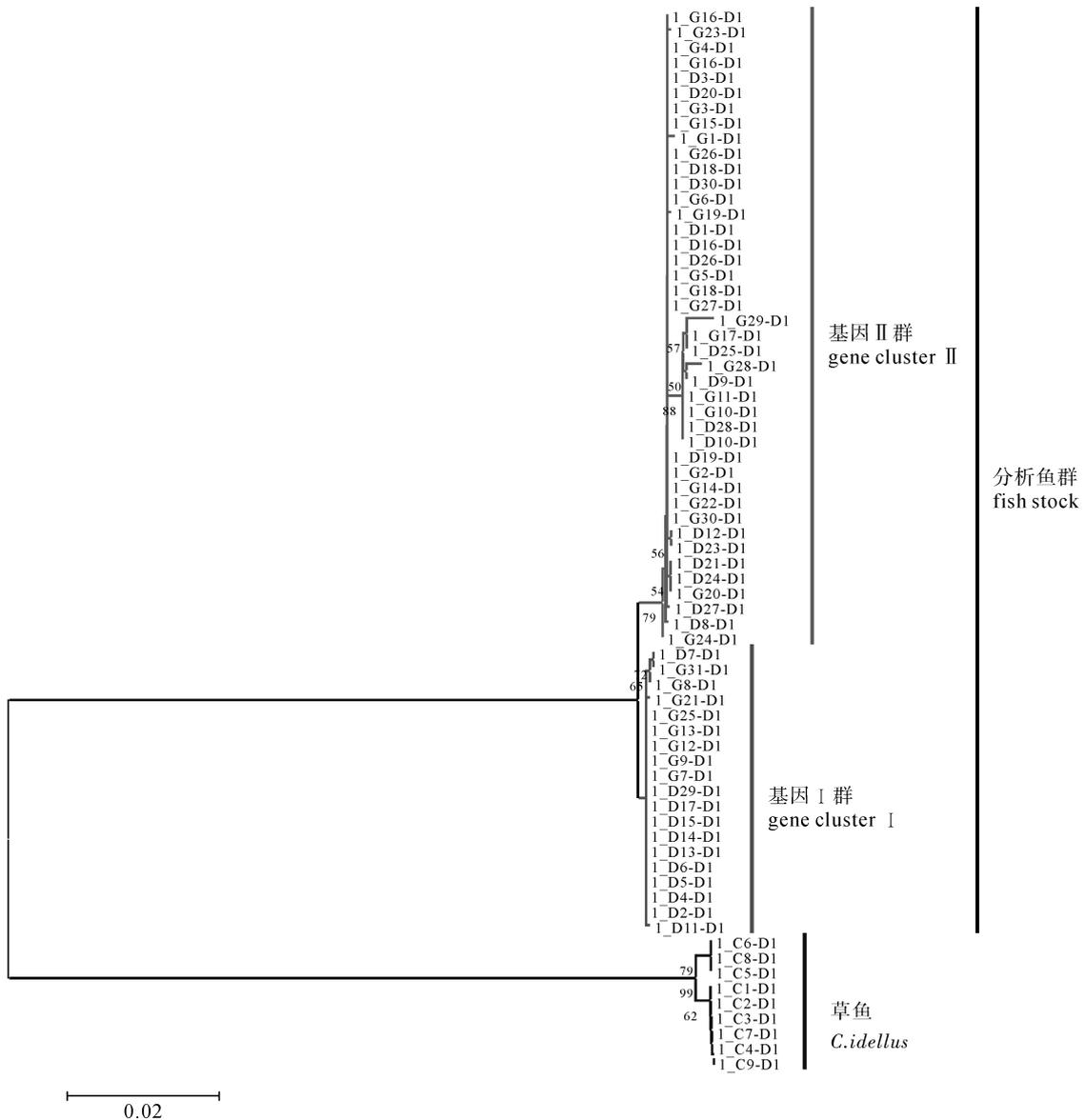


图 2 D-loop 序列 UPGMA 系统树

进化树上名称含义举例说明如下：C7. 第 7 号草鱼的样品；D2. 达里湖第 2 号鱼的样品；G11. 岗更湖第 11 号鱼的样品

Fig. 2 UPGMA phylogenetic tree based on D-loop sequences

The codes in the UPGMA phylogenetic tree are illustrated as follows: C7. No. 7 grass carp samples; D2. No. 2 fish samples in Lake; G11. No. 11 fish samples in Ganggeng Lake

传距离既能反映一个群体内的遗传多样性，也可以反映不同群体间的遗传组成分化程度。SHAKLEE 等^[22]报道鱼类在属、种和种群几级水平上的遗传距离 D 值的分类判据分别为 0.90、0.30 和 0.05。该研究中东北雅罗鱼 2 个自然种群间的遗传距离为 0.007 0，说明其自然种群间的遗传分化远未达到种群的分化标准，其原因可能是它们分布于同一地区相近湖泊，历史上遇到特大暴雨，水位上涨两湖有时会相连，可能会发生基因交流。2 个群体间的遗传距离均未达到种群水平上的分类标准，因此可认为达里湖和岗更湖 2 个地理群体的东北雅罗鱼属于同一个种群。虽然达里湖和

岗更湖鱼群的进化方向类似，但岗更湖群体 D-loop 基因的平均遗传距离大于达里湖群体，前者群体 D-loop 基因进化速度可能大于后者。

3.4 内蒙古地区东北雅罗鱼群体多样性保护和合理利用

内蒙古地处边远地区，有着丰富的生物多样性，同时各个物种又有丰富的遗传多样性。遗传多样性是物种或种群长期进化的产物，也是生物多样性的基础，且影响其生存适应和发展进化。一个种群的遗传多样性越高，对栖息环境的生存能力和环境变迁的适应能力就越强，种群延续

发展就越容易；遗传多样性低，对环境的适应能力就弱，在自然界进化过程中被淘汰的可能性就越大。据报道，东北雅罗鱼体内含有多糖粘蛋白质，能促进细胞发育和提高机体免疫力，对代谢性疾病和身体虚弱有较好的疗效，且营养价值高，所以市场需求量大。特别是近几年，对东北雅罗鱼的需求急剧增加导致了持续过度捕捞，使得内蒙古地区野生瓦氏雅罗鱼的群体数量日益下降，资源严重衰退，出现个体小型化、低龄化，渔获量大大幅度下降，种质资源受到严重的威胁。该研究显示岗更湖东北雅罗鱼多样性高于达里湖，可采取每年将一定数量的岗更湖东北雅罗鱼放流到达里湖；在繁殖季节建立休渔期制度，保护产卵场；确定捕捞规格，限制捕捞量；逐步提高达里湖东北雅罗鱼群体的遗传多样性。另外，应开展对内蒙古东北雅罗鱼不同地理群体遗传多样性的研究，为该鱼种质资源的保护与利用尽可能多地积累基础数据。

参考文献：

- [1] 安晓萍, 孟和平, 杜昭宏, 等. 达里湖东北雅罗鱼的生长、死亡和生活史类型的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(6): 3-7.
- [2] BROWN W M, GEORGE M, WILSON A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(4): 1967-1971.
- [3] GILLES A, LECOINTRE G, MIQUELIS A, et al. Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using mitochondrial control region[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 19(1): 22-33.
- [4] 郝君, 杨蕾, 鲍迪, 等. 6 种鱼 mtDNA D-loop 及其邻近区段的序列比较分析[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(2): 160-165.
- [5] 周其椿, 林艳红, 彭江涛, 等. 普安银鲫 mtDNA D-loop 序列多态性分析[J]. 广东农业科学, 2012(22): 173-175.
- [6] 冉光鑫, 代应贵, 岳晓炯. 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区的结构及遗传多样性[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 176-182.
- [7] 肖永双, 张岩, 高天翔. 基于线粒体 DNA 部分片段探讨石鲮与星突江鲮的亲缘关系[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2010, 40(6): 69-76.
- [8] 姚茜, 杨频, 陈立侨, 等. 罗氏沼虾三群体线粒体 D-loop 基因序列差异的初步研究[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 18-22.
- [9] 董志国, 李晓英, 王普力, 等. 基于线粒体 D-loop 基因的中国海三疣梭子蟹遗传多样性与遗传分化研究[J]. 水产学报, 2013, 37(9): 1304-1310.
- [10] 黄雪贞, 钱国英, 李彩燕. 中华鳖 3 个地理群体线粒体基因 D-loop 区遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 17-22.
- [11] 刘金亮, 常玉梅, 徐丽华, 等. 东北雅罗鱼微卫星分子标记的筛选及特征分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 87-93.
- [12] 刘金亮. 东北雅罗鱼微卫星分子标记的筛选及雅罗鱼 5 个野生群体遗传多样性分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- [13] 池炳杰, 常玉梅, 闫学春. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 228-235.
- [14] 黄志坚, 徐晓鹏, 唐晶晶, 等. 鱼类线粒体 DNA 控制区扩增引物及其设计方法和应用: 中国, 200710028242.1[P]. 2007-05-25.
- [15] 黄志坚, 徐晓鹏, 唐晶晶等. 淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 基因的引物设计 and 应用[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(4): 84-88.
- [16] 赵良杰, 何光喜, 周小玉, 等. 千岛湖大眼华鳊形态度量学和 D-loop 序列分析[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 351-357.
- [17] 郑文娟, 来育洪, 尤昕煜, 等. 舟山小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区序列变异的遗传多样性分析[J]. 动物学研究, 2012, 33(3): 329-336.
- [18] BROUGHTON R E, ROE B A. The complete sequence of the zebra fish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA[J]. Genome Res, 2001, 11(11): 1958-1967.
- [19] KONG Q P, YAO Y G, HUANG S Y. Mitochondrial DNA control region and cytochrome *b* sequence variation in the genus *Mystacoleucus* Gunther (Pisces: Cyprinidae: Barbinae) from China [J]. Biochem Genet, 2003, 41(9): 305-313.
- [20] 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[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 196-200.
- [21] 齐景伟, 安晓萍, 孟和平, 等. 达里湖瓦氏雅罗鱼资源现状及合理利用探讨[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(1): 71-76.
- [22] SHAKLEE J B, TAMARU C S, WAPLES R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoresis analysis of proteins[J]. Pac Sci, 1982, 36(2): 141-157.