

# 豫北泥鳅线粒体 DNA 16S rRNA 和 12S rRNA 基因序列的遗传多样性分析

杜启艳, 董方娟, 常重杰

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 为了评价豫北地区泥鳅种质资源的多样性, 以采自新乡地区泥鳅种群中的 11 个个体为材料, 利用 PCR 技术扩增其线粒体 16S rRNA 和 12S rRNA 基因的部分序列, 利用 Clustalw 2.0 和 DNAsp 4.10 软件分析了不同个体间的差异和遗传多样性。结果表明: 16S rRNA 和 12S rRNA 基因种内个体间的差异分别为 0.25% 和 0.97%, 二者的分化程度较低; 16S rRNA 的进化速度约为 12S rRNA 基因的 4 倍。16S rRNA 和 12S rRNA 种群群体的单倍型间平均遗传距离分别为 0.002 7、0.001 6, 单倍型多样性指数分别为 0.873、0.327, 核苷酸多样性指数分别为 0.002 65 和 0.000 81, 平均核苷酸差异数分别为 1.636 和 0.327。可见, 豫北泥鳅种群具有较低的遗传多样性。

**关键词:** 泥鳅; 遗传多样性; 16S rRNA 基因; 12S rRNA 基因

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)11-0137-05

## Genetic Diversity of the mtDNA 16S rRNA and 12S rRNA Genes in the Population of *Misgurnus anguillicaudatus* from North Henan

DU Qi-yan, DONG Fang-juan, CHANG Zhong-jie

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian 453007, China)

**Abstract:** In order to accurately evaluate the diversity of germplasm resources, to provide basic data and theoretical guidance for the genetic breeding of loach, the mtDNA 16S rRNA and 12S rRNA genes fragment of 11 individuals from the population of *M. anguillicaudatus* from the Xinxian of Henan were amplified by PCR. The genetic diversity and sequence variation were studied via Using Clustalw 2.0 and DNAsp 4.10 software. These results indicated that the sequence variation among individuals were 0.97% and 0.25%. The genetic divergence was exceptionally low and the evolution rate of 16S rRNA was four times that of 12S rRNA. For the mtDNA 16S rRNA and 12S rRNA genes, the average genetic distance among the haplotypes in the population was 0.002 7 and 0.001 6, and the haplotype diversity was 0.873 and 0.327. The nucleotide diversity of the 11 individuals was 0.002 65 and 0.000 81, and the average number of nucleotide differences was 1.636 and 0.327. The results demonstrated that the genetic diversity of the population of *M. anguillicaudatus* from North Henan was very low and the protection for the population is necessary.

**Key words:** *Misgurnus anguillicaudatus*; genetic diversity; 16S rRNA gene; 12S rRNA gene

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 花鳅亚科 (Cobitidae) 泥鳅属 (*Misgurnus*)。前人关于泥鳅的研究主要集中在 2 个方面: 一是利用各种分子标记研究基因组 DNA

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771666)

作者简介: 杜启艳 (1965-), 女, 河南卫辉人, 教授, 硕士, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: 041019@htu.cn

的遗传多样性。利用生化标记分析了不同群体同工酶的变异和遗传分化<sup>[1-2]</sup>。常重杰等<sup>[3]</sup>应用 RAPD 技术分析了三大水系中游的不同泥鳅群体间的遗传变异,结果表明武汉泥鳅群体内遗传变异程度较高;李殿香等<sup>[4]</sup>用 RAPD 技术对南四湖的泥鳅进行了初步分析,发现种群遗传距离偏大。曾柳根等<sup>[5]</sup>用 SSR 技术分析了长江流域 6 个泥鳅群体的遗传差异,表明泥鳅群体的遗传多样性中等偏低;单磊等<sup>[6]</sup>利用 SSR 技术分析长江中下游 4 个二倍体泥鳅野生种群的遗传多样性,发现其遗传多样性处于中等水平。二是以线粒体 DNA(mtDNA)为对象分析其遗传多样性和系统进化<sup>[7]</sup>。目前,关于泥鳅 mtDNA 的研究主要集中于细胞色素(Cyt)b 基因和 D-loop 区:Yang 等<sup>[8]</sup>分析了华中地区存在的二倍体和四倍体 Cyt b 基因的变异和进化;Doadrio 等<sup>[9]</sup>基于 Cyt b 基因研究了非洲伊比利亚泥鳅的亲缘关系;Yuichi 等<sup>[10]</sup>分析了日本佐渡岛上泥鳅线粒体 D-loop 区,发现当地种群的核苷酸多样性明显大于其他种群。张际峰等<sup>[11]</sup>对泥鳅 18S rRNA 基因与其线粒体 12S rRNA、16S rRNA、Cyt b 基因、D-loop 区基因进行序列比较,发现核 18S rRNA 最保守,而线粒体 D-loop 区基因进化速率最快。这些研究结论为分析泥鳅的遗传多样性奠定了技术基础。

河南省新乡地处黄河中下游,区内有大量黄河故道湿地和水田,具有人工养殖泥鳅的条件和天然优势,近年来泥鳅的养殖面积和产量不断提高。但目前该区泥鳅养殖所用材料均取自于野生群体,没有进行人工选择或培育。因此,为进一步提高泥鳅的产量和质量,急需具有较好养殖特性的泥鳅新品种。遗传多样性和遗传变异的研究是新品种培育的前提条件。目前,关于豫北新乡地区泥鳅遗传多样性的研究较少,为此,本研究以该区泥鳅线粒体 16S rRNA 基因和 12S rRNA 基因为标记,研究其种群的遗传多样性特征,旨在为泥鳅新品种的培育奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试动物

供试泥鳅采自新乡市延津黄河故道。选择体质健壮、发育良好、无伤病、各鳍完整的泥鳅作为试验材料,共 11 尾,分别命名为 N1—N11。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组的提取采用血液提取法,参常规酚-氯仿法<sup>[12]</sup>,所提 DNA 利用琼脂糖凝胶电泳检测浓度和纯度。双蒸水溶解

后置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 引物设计 用于扩增 16S rRNA 基因片段的通用引物为 16S-F: 5'-CGCCTGTTTACCAAAAACAT-3'和 16S-R: 5'-CCGGTCTGAAGTCAGATCA-3',扩增片段长约 620 bp。扩增 12S rRNA 基因片段的特异引物为 12S-F: 5'-GGTAAACTCGTGCCAGC-3'和 12S-R: 5'-GGGTAGCGAACGAAGTG-3',扩增长度约 450 bp。引物均由生工生物(上海)股份有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增与测序 用  $2\times\text{Taq Plus Master Mix}$ (北京康为世纪生物科技有限公司)进行 PCR 扩增,反应体系为: $2\times\text{Taq Plus Master Mix}$  25  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 2  $\mu\text{L}$ (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ),模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ (约 50 ng),补水至总体积 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增在 Biometra 扩增仪上进行,反应条件为  $95^{\circ}\text{C}$  变性 3 min; $94^{\circ}\text{C}$  40 s, $53^{\circ}\text{C}/57^{\circ}\text{C}$ (16S rRNA/12S rRNA) 1 min, $72^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环; $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测,紫外灯下切割目的条带,用 UNIO-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒[生工生物(上海)股份有限公司]进行回收纯化。序列测定由生工生物(上海)股份有限公司进行。

1.2.4 数据分析 测序序列首先在 NCBI 中进行 BLAST 相似性搜索,确定所得序列均为 16S 或 12S rDNA 序列。在 Clustalw 2.0 中进行序列比对,以确保序列的准确性。应用 DNAsp 4.10 软件对多态位点数、转换/颠换值、单倍型数、核苷酸多样性指数、平均核苷酸差异数、单倍型多样性指数等遗传多样性参数进行计算<sup>[13]</sup>;用 MEGA 4.0 软件,选取基于 Kimura 2-parameter 遗传距离的模型,构建 UPGMA 系统树,自展值(Bootstrap)设为 1 000。

## 2 结果与分析

### 2.1 碱基组成和序列变异

分别对 11 尾泥鳅个体 16S rRNA 和 12S rRNA 的基因片段测序比对,分别得到 621、407 bp 的同源序列。在 12S rRNA 基因片段中 T、C、A、G 4 种碱基的平均含量分别为 23.1%、24.0%、30.4%、22.5%(表 1)。A+T、C+G 的平均含量分别为 53.5%、46.5%。11 个泥鳅个体共检测到 6 个变异位点,约占分析总位点的 0.97%,其中 A/G 转换(transition)位点为 255、364、382,T/C 转换位点为 124、575,A/T 颠换(transversion)位点为 355,转换/颠换值( $T_s/T_v$ )为 5.0。无碱基的插入与缺失,共检测到 7 个单倍型。

16S rRNA 基因片段的 407 bp 中 T、C、A、G 4 种碱基的平均含量分别为 22.7%、26.7%、30.2%、20.4%(表 1)。A+T、C+G 的平均含量分别为 52.9%、47.1%,11 个泥鳅个体共检测到 1 个

变异位点,即 76 位的 T/C 转换,约占分析总位点的 0.25%。在 191 位发生 A 插入/缺失,共检测到 3 个单倍型。16S rRNA 的进化速度约为 12S rRNA 基因的 4 倍。

表 1 泥鳅 16S rRNA 和 12S rRNA 基因片段的核苷酸组成 %

个体	16S rRNA				12S rRNA			
	T	C	A	G	T	C	A	G
N1	22.6	26.8	30.2	20.4	23.2	24.0	30.2	22.6
N2	22.9	26.5	30.2	20.4	23.2	24.0	30.2	22.6
N3	22.6	26.8	30.2	20.4	23.2	24.0	30.3	22.4
N4	22.6	26.8	30.2	20.4	22.9	24.2	30.4	22.5
N5	22.9	26.5	30.2	20.4	23.0	24.1	30.6	22.3
N6	22.7	26.8	30.0	20.4	23.1	24.0	30.5	22.4
N7	22.6	26.8	30.2	20.4	23.1	24.0	30.5	22.4
N8	22.6	26.8	30.2	20.4	23.1	24.0	30.5	22.4
N9	22.6	26.8	30.2	20.4	23.1	24.0	30.3	22.6
N10	22.6	26.8	30.2	20.4	23.1	24.0	30.2	22.7
N11	22.6	26.8	30.2	20.4	23.1	24.0	30.5	22.4
平均	22.7	26.7	30.2	20.4	23.1	24.0	30.4	22.5

2.2 遗传多样性分析

由表 2 可知,11 尾个体 16S rRNA 序列核苷酸多样性指数为 0.002 65,平均核苷酸差异数为 1.636,单倍型多样性指数为 0.873。11 尾个体 12S rRNA 序列核苷酸多样性指数为 0.000 81,平均核苷酸差异数为 0.327,单倍型多样性指数为 0.327。说明被测试泥鳅群体的遗传多样性较低。

表 2 新乡泥鳅群体内 16S rRNA 和 12S rRNA 基因核苷酸序列多态性

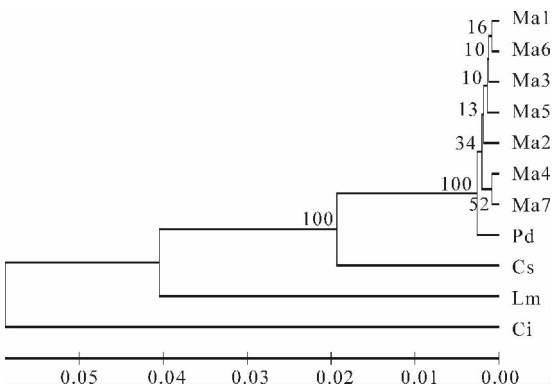
基因	变异位点数	单倍型数	单倍型多样性指数	核苷酸多样性指数	平均核苷酸差异数
16S rRNA	6	7	0.873	0.002 65	1.636
12S rRNA	1	3	0.327	0.000 81	0.327

根据核苷酸序列的多态性,采用 MEGA 4.0 软件计算了该种群中 2 种 rRNA 的不同单倍型间的遗传距离,发现 16S rRNA 单倍型间遗传距离最大为 0.006 5,最小遗传距离为 0.001 6,平均遗传距离为 0.002 7。12S rRNA 单倍型间遗传距离为 0~0.002 5,平均遗传距离为 0.001 6。

2.3 UPGMA 分子系统树

采用不加权配对组算术方法(UPGMA)分别构建泥鳅种群 16S rRNA 和 12S rRNA 单倍型的分子系统树。结果表明,新乡泥鳅种群 16S rRNA 7 种单倍型(Ma1—Ma7)聚为 2 个分支(图 1),其中 Ma1、Ma2、Ma3、Ma5、Ma6 聚为一支,包括 9 个个

体,Ma4 和 Ma7 聚成一个分支,包括 2 个个体。12S rRNA 3 种单倍型(Mah1—Mah3)的分子系统树也表明,泥鳅新乡种群聚为 2 个分支(图 2)。根据 mtDNA 为母系遗传,由此推测这 11 个个体可能分别来自 2 个母系或繁殖群体。



Lm. 长薄鳅(NC\_008677.1); Ci. 纓口鳅(M91245.1); Cs. 沙花鳅(AY526868.1); Pd. 大鳞副泥鳅(AY009148.1)。下图同

图 1 基于 16S rRNA 基因片段序列构建的 UPGMA 系统树

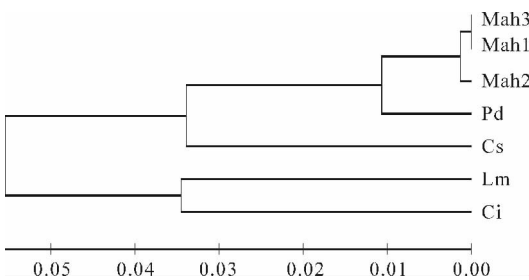


图 2 基于 12S rRNA 基因片段序列构建的 UPGMA 系统树

### 3 讨论

在物种的遗传多样性研究中,由于 mtDNA 序列直接反映了碱基的置换、插入、缺失等变异特点,通过分析不同物种或个体碱基序列的异同分析物种的遗传多样性,较之其他方法具有更大的优点<sup>[14]</sup>。mtDNA 16S rRNA 和 12S rRNA 基因具有较高的保守性,便于 PCR 引物的设计和扩增,极其适合于种及种以上的遗传多样性分析。

有资料表明,在其他动物的群体遗传和进化研究中,同一种的不同个体间一般有 0.1%~5% 的趋异(视不同物种以及群体的分化程度而定)<sup>[15]</sup>。新乡泥鳅群体中,16S rRNA 基因表现出序列差异为 0.25%,12S rRNA 基因表现出序列差异为 0.97%。这说明在 16S rRNA 和 12S rRNA 这 2 个基因上,新乡泥鳅的分化是极低的;12S rRNA 的进化速率约为 16S rRNA 的 4 倍,与张际峰等<sup>[11]</sup>对泥鳅不同基因的进化速率的研究结果一致。线粒体基因组中不同区域的核苷酸突变速率不同或不同的基因片段受到的选择压力差异可能是导致线粒体不同基因片段的核苷酸替代速率差异的原因<sup>[7]</sup>。

新乡泥鳅群体 12S rRNA 基因个体之间的转换/颠换值为 5.0,16S rRNA 基因没有发生颠换,这表明个体之间的碱基变异主要是转换,而甚少发生颠换。一般认为转换/颠换值小于 2.0 表明 DNA 序列的突变已经达到饱和状态<sup>[16]</sup>,可见新乡泥鳅群体 2 个基因并未达到饱和。上述碱基构成的偏差以及较高的转换/颠换值从另外一个侧面证实本研究所分析的核苷酸序列是线粒体基因而不是核基因的假基因<sup>[17]</sup>。

衡量某一种群 mtDNA 遗传变异的 2 个重要指标是单倍型间的平均遗传距离和核苷酸多样性。一般而言,一个群体内群体的遗传多样性可以通过遗传距离进行衡量,而核苷酸多样性指数兼顾了不同 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例,因此能够比单纯的遗传距离平均值更准确地反映一个群体的 mtDNA 多态性<sup>[18]</sup>。在新乡泥鳅种群中,序列的核苷酸多样性指数为 0.002 65(16S rRNA)和 0.000 81(12S rRNA);单倍型多样性指数为 0.873(16S rRNA)和 0.327(12S rRNA),与其他鱼类相比处于较低水平,说明新乡泥鳅种群遗传多样性较低<sup>[14]</sup>。

Shaklee 等<sup>[19]</sup>提出了鱼类在属、种和种群 3 级水平上遗传距离分别为 0.90、0.30、0.05 的分类判别标准;另有研究<sup>[20]</sup>表明,DNA 序列间遗传距离的

差异如果小于 2%,则小于种内的遗传差异。新乡泥鳅种群 mtDNA 单倍型间平均遗传距离为 0.002 7(16S rRNA)和 0.001 6(12S rRNA)。可见,该种群的遗传分化远未达到种群分化的标准。物种对环境变化适应能力的主要标志是遗传变异的大小。遗传变异较低的物种在不同的环境中由于具有较低的种群恢复潜力而具有较高的种群灭绝风险,而遗传变异较高的物种则具有较高的生态适应性<sup>[21]</sup>,因而对物种遗传变异水平的研究是至关重要的。在进行物种的遗传多样性研究时,单个基因能提供的信息往往较为有限。因此,为进一步阐明本地区泥鳅的遗传多样性,今后拟采用进化速率不同的多个基因(包括线粒体和核基因)进行研究,为该物种的遗传育种提供理论支撑。

#### 参考文献:

- [1] Khan M R, Arai K. Allozyme variation and genetic differentiation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Fisheries Science, 2000, 66(2): 211-222.
- [2] 吴艳丽, 常重杰. 3 个地理居群泥鳅的同工酶生化遗传分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(11): 37-42.
- [3] 常重杰, 周荣家, 余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 动物学报, 2001, 47(1): 89-93.
- [4] 李殿香, 王金星, 王来元. 南四湖泥鳅和大鳞副泥鳅随机扩增多态 DNA 分析初报[J]. 四川动物, 2003, 22(1): 6-9.
- [5] 曾柳根, 张伟, 甘云飞, 等. 鄱阳湖泥鳅的遗传多样性研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 966-972.
- [6] 单磊, 魏开建, 张桂蓉, 等. 长江中下游二倍体泥鳅 4 个种群的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 453-458.
- [7] 毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳊鱼线粒体 16S rRNA、COI 和 Cyt b 基因片段序列的比较研究[J]. 南方水产, 2009, 5(3): 46-52.
- [8] Yang C T, Cao L, Wang W M, et al. Comparative and evolutionary analysis in natural diploid and tetraploid weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* based on cytochrome b sequence data in central China[J]. Environ Biol Fish, 2009, 86(1): 145-153.
- [9] Doadrio I, Perdiges A. Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis*, cobitidae) based on cytochrome b sequence data[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 37(2): 484-493.
- [10] Yuichi K, Katsutoshi W, Shin N, et al. Population genetic structure, diversity and stocking effect of the oriental weatherloach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in an isolated island[J]. Environ Biol Fish, 2011, 90(3): 211-222.

(下转第 146 页)

- [1] 测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 混合感染方法的建立[J]. 河南农业科学, 2013, 42(2): 123-127.
- [3] 夏俊, 石进纯, 成进, 等. 复合 RT-PCR 检测猪繁殖与呼吸综合征和猪瘟及猪流感等 3 种病毒方法的建立[J]. 现代农业科技, 2013(17): 275-277.
- [4] 王小敏, 何孔旺, 周忠涛, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株的分离鉴定及遗传变异分析[J]. 华北农学报, 2014, 29(1): 232-238.
- [5] 王小敏, 李燕华, 蔺涛, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒野毒株持续性感染细胞模型的建立[J]. 华北农学报, 2012, 27(5): 150-156.
- [6] 蒋志政, 张改平, 刘明阳, 等. 抗猪 FcyR II b 多抗阻断猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体依赖增强作用研究[J]. 河南农业科学, 2012, 41(4): 139-142, 145.
- [7] 夏九鲜, 李锐, 周显珍, 等. PRRSV 感染不同时期 IFN- $\gamma$  表达量分析[J]. 现代农业科技, 2013(5): 275-276.
- [8] 赵亮, 赵瑞萍, 李向阳, 等. 中草药饲料添加剂在畜禽上应用研究进展[J]. 山西农业科学, 2014, 42(2): 206-208.
- [9] 李雪, 张会从, 李勉, 等. 三种中药复方体外抗高致病性蓝耳病毒的效果观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(3): 132-134.
- [10] Chen M, Xie H, Yang L, et al. *In vitro* anti-influenza virus activities of sulfated polysaccharide fractions from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Virol Sin, 2010, 25(5): 341-351.
- [11] 赵昕, 孙娜, 白喜云, 等. 苦参碱对 PRRSV 的体外抑制作用及其机制[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(6): 808-812.
- [12] 管远红, 赵旭庭, 王健, 等. 中药防治猪繁殖与呼吸综合征的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(10): 28-30.

(上接第 140 页)

- [11] 张际峰,蒋磊,牛坤,等.泥鳅和黄鳝 18S rRNA 基因的克隆与序列分析[J].吉林大学学报:理学版,2009,47(4):846-851.
- [12] Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989:931-958.
- [13] Rozas J, Sanche-delBarrio J C, Messenguier X, *et al.* DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2496-2497.
- [14] 马春艳,马凌波,倪勇,等.基于形态特征和线粒体 16S rRNA 基因序列探讨棱鳊属的系统进化[J].中国水产科学,2010,17(3):471-447.
- [15] Avise J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall, 1994: 1-5.
- [16] 江世贵,张殿昌,吕俊霖,等.3 种野鲮亚科鱼类 16S rRNA 基因序列分析[J].南方水产,2005,1(1):1-5.
- [17] 童金苟,吴清江.三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性[J].水生生物学报,2001,25(1):54-60.
- [18] 周慧,李迪强,张于光,等.藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究[J].遗传,2006,28(3):299-305.
- [19] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins[J]. Pacific Science, 1982, 36(2):141-157.
- [20] 杜启艳,常重杰. DNA 条形码在鉴别物种中的应用[J],生物学教学,2010,35(12):60-61.
- [21] 吕振明,许逸天,吴常文,等.中国沿海不同地理群体 16S rRNA 基因的遗传变异分析[J].中国水产科学,2010,17(3):463-447.