

文章编号: 1674-5566(2012)05-0684-09

鲢长江群体与国外移居群体间遗传变异的主要组织相容性复合体分析

冯 维¹, 刘至治¹, 李思发², 李雪松¹, 唐文乔¹, 杨金权¹

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 利用 MHC I 类 α_2 结构域基因片段, 分析鲢长江群体 (YZL) 与多瑙河群体 (DAN)、密西西比河群体 (MIS) 间的遗传变异。从 3 群体共 40 尾个体的 117 个有效克隆中, 获得 MHC I 类 α_2 结构域等位基因 68 个。主要结果为: (1) YZL、DAN 和 MIS 群体的等位基因数分别为 21、27 和 20 个, 且群体间核苷酸序列 (54.1% ~ 99.5%)、氨基酸序列 (39.4% ~ 98.6%) 的同源性变异范围大, 揭示 3 群体 MHC I 类 α_2 结构域的多态性都较丰富。(2) 群体内平均核苷酸/氨基酸序列同源性的顺序为 MIS > DAN > YZL; 而群体内核苷酸/氨基酸多样性指数 (π/π_{aa}) 的大小顺序恰与此相反, 表明鲢 YZL 群体 MHC I 类 α_2 结构域的变异较 DAN 和 MIS 群体大。(3) 以氨基酸序列进行 AMOVA 分析的结果表明, 3 群体间、国内群体与国外移居群体间都存在显著的遗传分化 ($P < 0.05$)。(4) 3 群体抗原结合区 (PBR) 的非同义碱基/同义碱基替换值 ω 的大小顺序为 YZL (1.652 5) > MIS (1.499 5) > DAN (1.337 0) > 1, 且在 PBR 区检测到 5 个正向选择位点, 揭示 3 群体鲢 MHC I 类分子均受到正向选择压力的作用, 其中 YZL 群体的选择压力最大。

研究亮点: 以 MHC I 类分子为手段, 分析鲢长江群体与国外移居群体 (匈牙利多瑙河、美国密西西比河) 间的遗传变异, 探讨不同群体间所受的正向选择压力的差异。

关键词: 鲢; 遗传变异; 主要组织相容性复合体; 移居群体
中图分类号: S 917
文献标志码: A

鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 属鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲢亚科 (Hypophthalmichthyinae)、鲢属 (*Hypophthalmichthys*), 在我国北起黑龙江, 中经黄河、淮河、长江、钱塘江、闽江、珠江, 南至红河的广泛水域均有分布^[1]。作为“四大家鱼”之一, 鲢一直是我国淡水养殖的主要对象之一, 在渔业生产中占有重要地位。历史上, 作为我国土著鱼类之一的鲢, 资源十分丰富, 特别是长江为其最重要的天然繁殖场所和种质资源库^[1-2]。然而, 自改革开放以来的 30 多年里, 过度捕捞、水域污染、环境巨变、大型水力设施对产卵场的破坏等诸多原因, 导致我国长江鲢天然鱼苗、成鱼产量均呈急剧下降趋势, 资源出现明显衰退^[2-3]。与此形成鲜明对照的是, 自 20 世纪 60 年代以来, 本着控制

藻类或发展水产养殖的目的, 鲢被移植到欧洲、美洲的许多国家和地区, 却在当地形成地方群体, 呈现不断扩张趋势, 资源量不断增加^[2]。关于长江流域鲢群体遗传多样性、遗传结构问题, 自 20 世纪 90 年代至今, 先后有同工酶^[4]、RAPD^[5]、SSR^[6-7]、RFLP^[8]等方面的报道。而从分子水平上探讨国内土著群体与国外鲢移居群体间遗传差异的报道却很少^[2,9]。2010 年, 严骏、唐文乔等应用 AFLP 技术的分析结果表明, 鲢长江老河与邗江群体间的遗传分化 F_{st} 值为 0.070 1 ($P < 0.01$)、中国土著群体与海外群体间总的 F_{st} 值为 0.042 4 ($P < 0.01$), 均存在显著的遗传分化^[2]。然而, AFLP 等中性分子标记的结果, 仍无法提供物种适应性的信息, 需要更为合适的方法进行验证、补充。

收稿日期: 2012-01-03 修回日期: 2012-04-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30630051); 上海市重点学科建设项目 (S30701)

作者简介: 冯 维 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类分子进化与免疫遗传学。E-mail: chiyou28@sina.com

通讯作者: 刘至治, E-mail: zzliu@shou.edu.cn

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是存在于脊椎动物体内与免疫应答密切相关的高度多态性基因群,它拥有极大数量的等位基因,赋予种群巨大潜力以适应多变的内外环境,是研究生物进化的良好遗传标记。与微卫星等大多数中性分子标记相比,MHC 基因更能反映出物种群体分化及适应性等方面的信息^[10-11]。近十几年来,MHC 基因的多态性被成功的应用于水产动物如大鳞大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)与银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)^[12]、红鲤(*Cyprinus carpio*)^[13]、中华鳖(*Trionyx sinensis*)^[14]等的群体遗传结构的分析中。本文利用 MHC I 类 α_2 结构域基因片段,从免疫遗传学角度,探讨鲢长江群体与存在巨大环境差异的欧、美移居群体间的遗传变异,为监测海、内外鲢自然群体的遗传变化趋势及评估群体的进化适应能力提供进一步的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲢野生群体样本共 40 尾,于 2007 年采自我国长江(老江河段)、匈牙利多瑙河及美国密西西比河(表 1)。所有样本均剪取部分尾鳍,置 95% 乙醇中于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 鲢群体采集信息

Tab. 1 The information of the samples of silver carp populations

群体	缩写	采集点	尾数
长江	YZL	湖北省老江河段	15
匈牙利	DAN	匈牙利 Faks 江段	12
美国	MIS	密西西比河 Nemana 支流	13

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取

剪取约 0.1 g 鳍条,采用常规酚-氯仿法,参照文献^[14]的操作步骤提取基因组 DNA。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度。溶解后的 DNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

1.2.2 PCR 扩增和 DNA 克隆测序

根据已报道的鲢 MHC I α_2 序列 Hymo-BX1 (ABO22886)^[15],设计一对特异性引物 Hymo-F

(5'- CAG CTG ATG TAC GGT TGT GA-3') 和 Hymo-R (5'-GCA TTG AGT GGC TGC AGA AG-3'),引物由上海生工生物工程服务有限公司合成,用于扩增鲢 MHC I α_2 结构域基因片断。PCR 反应体系 50 μL :基因组 DNA 2 μL (约 100 ~ 150 ng),10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 2 μL ,5 μL 10 \times PCR Buffer, dNTP Mixture(每种 2.5 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL ,1.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL),35.8 μL ddH₂O。dNTP Mixture 和 *Taq* DNA 聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司。反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;接着 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min。所有反应于 Mastercycler ep gradient (Eppendorf) S 型 PCR 仪上进行。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳(5 V/cm)后,切割目的条带,用 Biospin Gel Extraction Kit(Bioflux)胶回收试剂盒纯化。将纯化产物与 T-easy 载体(TaKaRa)连接转入 TOP10 (Tiangen)感受态细胞。根据蓝白斑原理,挑选白色菌落,用 M13 + / - 引物做菌落 PCR、鉴定阳性克隆,每个体随机测序 3 个克隆(由上海美吉生物医药科技有限公司的 ABI3730 测序仪测序)。

1.3 序列分析与选择压力检测

1.3.1 序列分析

为避免因 PCR 错配、测序等人为错误而导致的假多态性,所有用于后续分析的序列均由不同个体或同一个体至少 2 次独立的 PCR 产物验证,且将那些与同源序列的非同义碱基替换位点不超过全长 1.5% 的序列,认定为假性等位基因^[16],然后根据 KLEIN 等^[17]的方法进行命名,如 Hymo-UA * 01(图 1)。这里,Hymo 代表鲢拉丁文名中的属名与种本名的前两个字母,UA 表示 MHC I 类 α 基因,“01”代表不同的等位基因。利用 Bioedit 对序列进行整理和人工校正^[18],用 Clustal X 进行序列的排列并以 Fasta 格式保存文件^[19]。用 Arlequin 3.0 计算各群体间核苷酸/氨基酸序列的多态位点数(S/S_{aa})、基因多态性指数(h/h_{aa})、平均成对核苷酸差异数(k/k_{aa})和核苷酸氨基酸多态性指数(π/π_{aa})、遗传分化指数(F_{st})等遗传多态性参数和进行分子方差分析(AMOVA)^[20]。用 MEGA 4.0 软件中的 Kimura 双参数遗传距离(Kimura 2-parameter distance, K2-P)和 Possion correction 法分别计算群体间核苷酸/氨基酸序列的遗传距离^[21],以此构建 NJ

树。分析核苷酸/氨基酸序列组成、统计单倍型,用修正后的 Nei 和 Gojobori (p-distance) 方法,计算抗原结合区(PBR)和非抗原结合区(non-PBR)的非同义碱基替换(d_N)与同义碱基替换(d_S)比值 ω ($\omega = d_N/d_S$)。用 Mrbayes 3.1.2 软件构建氨

基酸序列的系统发育树时^[22],替代模型设定为 GTR,位点间差异比率设为 gamma,使用马可夫链-蒙特卡罗(MCMC)数据模型来估算后验概率,运算进行 1 000 000 代,取样频率为 1 000,并从 GenBank 上下载鲤鱼序列(X91015)做外群。

α_2 domain	96	105	115	125	135	145	155	165	172
Hymo-Bx1	QRMYGCEWDD	QTGAIDGFRQ	YSYDGEDFLS	LDLKEMRYIS	PKEQGFSTVQ	KWNND-RANL	EYRKHYLSTV	CIEWL-K	
Hymo-UA*24	.L..... K. A. . .	. G. LI. VP. . IPSI. -E. D. V. N. F. . E Q.	
Hymo-UA*26	.L..... R. TN. . I. .	. EGF. W. T VQ. I. KN-S. YI SD. FN. E Q.	
Hymo-UA*57	.L..... ET. . L. EG. VH. P. K C. -G. FI KND. R. YKDL Q.	
Hymo-UA*63	.L..... Y. SK. A. P G. LI. VPE. IPSI. TI-E. D. V. N. F. . E Q.	
Hymo-UA*01	.L..... E. TN. . L. NG. Y M. W. VQ. MPS. L. -SRS NN. Y. Q.
Hymo-UA*37	.L..... EET. L. G. E. C. QVP. II. R. -D. Y. Q.
Hymo-UA*18	.L..... K. R. ET. L. E. W. VQ. II. Y -N. D. E
Hymo-UA*09	.L..... E. TKR. Y. DG. Y S. W. VQ. IP. I. S. -F. SENN. P.
Hymo-UA*11	.L..... E. TN. . L. NG. Y M. W. VQ. IP. I. -FF SENN. S. Q.
Hymo-UA*36	.L..... L. DG-STR. YF. G. I. KSTRTRTA ANP. AVI. ET DAT-G. GA N. W. G. ENT
Hymo-UA*02	.L..... L. HG-TKR. YM. IG. T KSTRTWTA SND. AMI. KV DST-G. EA NVQSN. DDT
Hymo-UA*05	.L..... LN. DG-TKR. YM. FG. T KNLTWTA SNP. AMI. KV DST-GVYA NSENN. DNT
Hymo-UA*13	.L..... LN. DG-STR. YW. G. A. V. KSTLTWTA ANP. AVI. KH EAL-GTEA A. Q. T. ENT
Hymo-UA*15	.L..... LN. DG-TKR. YM. FG. T KNLTWTA SND. AMI. KV DST-G. EA NVQSN. DNT
Hymo-UA*19	.L..... LN. DG-STR. YY. HG. V. KSTLWTV ATPEHMI. KI EAKE. FA W. G.
Hymo-UA*21	.L..... LN. DG-STR. YY. G. V. KSTLTWTA ANPEAMI. KI EAKE. FA W. G.
Hymo-UA*23	.L..... L. DG-TKQ. YM. HG. V. T KSTRTWTA TND. AMI. KV DST-G. EA NVQSN.
Hymo-UA*30	.L..... LN. DG-TTQ. DG. G. A. V. KSTLTWTA ANP. AVI. KH EAN-. PYG QW. E.
Hymo-UA*31	.L..... LN. DG-STR. Y. G. T KSTRTWTA SND. AMI. KV DST-G. EA NVQSN. DNT
Hymo-UA*38	.L..... L. DG-STR. YF. G. I. KSTRTWTA ANP. AVI. KN EGT-G. EA N. W. G. PENT
Hymo-UA*43	.L..... L. DG-NTQ. YW. IG. I. F. KNLT. TA ANP. AGI. K. DTN-. QM N. G.
Hymo-UA*46	.L..... LN. DG-TTQ. YK. FG. G. A. V. F. KNALTWTA ANP. AVI. KH EAN-. PYG W. G.
Hymo-UA*48	.L..... L. HG-STR. YF. G. I. KSTLTWTA ANPEAMI. KV REAKE. FA W. G.
Hymo-UA*59	.L..... L. DG-STR. YF. NG. T KSTRTWTA ANP. AVI. KD EGT-G. EA NDW. G. ENT
Hymo-UA*61	.L..... LN. DG-STR. Y. G. G. V. F. KSTLT. TA ANPEAVI. KH EAN-. PYG QW. G.
Hymo-UA*67	.L..... AN. DG-STR. YY. G. VA. G. KSTLTS. ANPEVMINKI EAKE. CA W. G.
Brre-UBA*01	.F..... M. DG-NKQVHW. IG. I. K. TLTWTA ANS. AMT. KV DST-G. EA N. W. G. ENE
Cyca-UA1*01	.Q..... LH. DG-TKG. YM. G. KSSLTWTA ANP. AVI. KV DST-. ET KSETN.
Ctid-UA01	.W..... L. DG-TKR. YM. G. A KSTLTWTA AVP. ATI. KK LDST-G. EA NSDNN. DNT
Xela-UAA1f	.W..... LG. DG-S. R. YE. HV. RE. FA TE. WV. VP SVREAQL. T. SPEVNAP RN. N. QNI
Trsi-BX1	.Q..... DLW. DG-TTE. . D. FA. R. V. F. KDILTWTA TDAGAQQ. K. EA-E. F. QSD. N. EQI
Gaga-B-F12	DW..... DILE GG-P. R. YY. MA. R. TA F. KGT. TFTA AVPEAVP. KR E--EESV RW. N. EET
HLA-A2	.L..... DVGS DWRFLR. YH. A. K. YIA KEDLSRWSWA ADMAAQT. KH E--AAHV QLRA. EGT
		* * * C	* * *	**		* **	* * *	** * C	* *

图1 鲢 MHC I α_2 结构域部分氨基酸序列与其他鱼类及人类同源序列比较

Fig.1 The comparison of partial amino acid sequences of MHC class I α_2 domain between silver carp and other species

这里只列出氨基酸差异大于或等于5个的序列,比中所用到的各序列如下:斑马鱼(Brre-UBA * 01, BC074095),鲤(Cyca-UA1 * 01, X91015),白鲢(Hymo-Bx1, AB022886. 1),草鱼(Ctid-UA01, AB109779. 1),非洲爪蟾(Xela-UAA1f, AF504019),中华鳖(Trsi-BX1, AB022885. 1),红原鸡(Gaga-B-F12, AY234768),人类(HLA-A2, K02883)。“*”代表位于人类HLA I类 α_2 结构域肽结合区的氨基酸位点^[26]，“C”代表保守的半胱氨酸位点，“.”代表一致的氨基酸，“-”代表缺失的序列。序列位置的排列与人类HLA-A2一致。

1.3.2 选择压力检测

用 PAML 4.0b 软件包中的 CODEML 程序^[23],检测氨基酸水平上的选择压力。该软件根据参数 ω 值的大小,推测目标序列是否受到选择压力。如果 $\omega > 1$,则表明存在正选择作用。适用于正选择作用检测的模型包括 M1a (nearly neutral)与 M2a (positive selection)、M7(β)与 M8 (β and ω)两组^[24]。当可替换模型 M2a、M8 存在位点 $\omega > 1$,则可被用于检测正向选择。首先计算每个模型的最佳似然值,因最佳似然值差异的两倍(2 Δ L)基本遵循卡方分布,然后根据卡方检验,即似然比测试(likelihood ratio test, LRT)来判断数据最适模型。最后通过对模型 M2a、M8 的经

验贝叶斯法(Bayes empirical Bayes, BEB)后验概率统计,来识别可能存在的正向选择位点^[25-26]。

2 结果

2.1 鲢 MHC I α_2 结构域的序列多态性

利用所设计的一对特异性引物,扩增 MHC I 类 α_2 结构域基因片段,对鲢中国长江群体(YZL)、欧洲多瑙河群体(DAN)、美国密西西比河群体(MIS)各 12 ~ 15 个体进行分析。结果表明,目的基因序列存在插入或缺失变异。从 3 群体共 40 尾个体的 102 个克隆中,分别获得长度为 225 bp、228 bp 的核苷酸序列 30 条和 38 条,不存在群体间共享的单倍型。DAN 群体的序列数最

多(27 条),而另两个群体的序列数量较少(20 ~ 21 条)。序列总的有效位点数为 231 个,其中多态位点 159 个(占 68.83%)。群体间的多态位点数比较接近,在 133 ~ 138 间。序列间的相似度在 54.1% ~ 99.5% 间,平均相似度为 75.48%,变异

很大,而各群体内序列的平均相似度大小顺序为: MIS (79.86%) > DAN (77.52%) > YZL (73.60%)。与此刚好相反,核苷酸多样性指数 (π) 和平均核苷酸差异数 (k) 的大小顺序却是 YZL > DAN > MIS(表 2)。

表 2 鲢群体遗传多态性指数

Tab. 2 The genetic diversity indexes for the three populations of silver carp

	YZL	DAN	MIS
核苷酸序列结果有效克隆数	45	35	37
不同序列数	21	27	20
多态位点数(S)	138	136	133
基因多态性指数(h)	1.0000 ± 0.0147	1.0000 ± 0.0101	1.0000 ± 0.0058
平均核苷酸差异数(k)	58.7571 ± 26.44	49.2963 ± 22.02	45.7158 ± 19.59
核苷酸多样性指数(π)	0.2611 ± 0.1312	0.2191 ± 0.1090	0.1921 ± 0.1069
平均同源性/%	73.60	77.52	79.86
氨基酸序列结果			
等位基因数	21	27	20
多态位点数(S_{aa})	57	55	50
基因多态性指数(h_{aa})	1.0000 ± 0.0147	1.0000 ± 0.0101	1.0000 ± 0.0034
平均氨基酸差异数(k_{aa})	26.4238 ± 12.02	23.4587 ± 10.62	20.5898 ± 10.97
氨基酸多样性指数(π_{aa})	0.3523 ± 0.1788	0.3128 ± 0.1576	0.2621 ± 0.1394
平均同源性/%	64.27	67.29	71.56

目的基因序列编码 76 个氨基酸,含 62 个多态位点。与已报道的 Hymo-BX1 序列 (AB022886)^[15] 相比,部分序列在 108 位点和 151 位点存在 G 的缺失或 E 的插入的变异;而 Hymo-BX1 则在 171 位点缺失 Q(图 1)。各群体氨基酸序列数为 20 ~ 27 条。氨基酸序列的相似度在 39.4% ~ 98.6% 间,平均相似度为 65.62%。3 群体的平均氨基酸差异数(k_{aa})、氨基酸多样性指数(π_{aa})的大小顺序与核苷酸序列的结果一致(表 2)。上述分析表明,鲢 YZL 群体 MHC I 类 α_2 结构域基因片段的变异较 DAN 和 MIS 群体大。

与其他物种比较后发现(图 1),鲢 MHC I 类 α_2 结构域片段中存在保守的半胱氨酸残基(C101 和 C166),而经典 MHC I 类分子的高度保守的 4 个关键性氨基酸(TKWY, T143, K146, W147, Y161)^[27] 在大部分序列都保守。这些都显示所得的 68 个序列为经典 MHC I 类分子。根据命名规则,3 群体的序列分别命名为: YZL 群体, Hymo-UA * 01 ~ Hymo-UA * 21; DAN 群体, Hymo-UA * 22 ~ Hymo-UA * 48; MIS 群体, Hymo-UA * 49 ~ Hymo-UA * 68 (GenBank 登录号:

JQ289925 ~ JQ289992)。

2.2 群体结构分析

以氨基酸序列为例进行 AMOVA 分析的结果表明,群体间存在显著的遗传分化 ($F_{st} = 0.04756, P < 0.001$)。在遗传差异的总变异中,95.07% 的差异来自各群体内部,仅 4.93% 的差异来自群体间。若将 DAN 群体与 MIS 群体合并为移居群体,再与长江群体(YZL)进行比较,则国外移居群体和中国本土群体间同样存在显著的遗传差异 ($F_{st} = 0.01627, P < 0.05$)。

3 群体间遗传分化指数 (F_{st}) 在 0.02637 ~ 0.06889 之间,彼此间均存在显著的遗传分化 ($P < 0.05$),其中 YZL 与 MIS 群体间的遗传分化指数最大, DAN 与 MIS 群体间的遗传分化指数最小。核苷酸序列的分析结果与此类似(表 3)。

3 群体间氨基酸序列的平均遗传距离中, YZL 与 MIS 群体间的值最大(0.5266), YZL 与 DAN 群体间的值最小(0.4593), DAN 与 MIS 群体间的距离居中(0.5028)。而群体间核苷酸序列遗传距离(0.2011 ~ 0.2324)的大小顺序与氨基酸序列的一致。以氨基酸序列的平均遗传距离构建的 NJ 树显示, YZL 首先与 DAN 聚为一

支,再与 MIS 聚类,说明鲢美国群体与中国长江群体的亲缘关系较远(图 2)。

表 3 鲢 3 群体间的遗传分化指数(F_{st})
Tab. 3 Population pairwise F_{st} values
for the three populations of silver carp

群体	YZL	DAN	MIS
YZL		0.044 01 *	0.068 89 *
DAN	0.043 31 *		0.026 37 *
MIS	0.065 06 *	0.037 48 *	

注:左下角为核苷酸;右上角为氨基酸;*表示 $P < 0.05$ 。

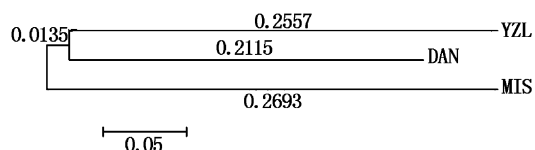


图 2 基于 MHC I α_2 结构域基因的氨基酸序列平均遗传距离构建的鲢 3 群体间的聚类关系(NJ 树)
Fig. 2 NJ tree for the three populations of silver carp based on the average genetic distances from amino acid sequences of the MHC I α_2 domain

2.3 系统发生分析

本研究中,在以 Mrbayes 法构建氨基酸序列的系统关系树时,为作图的方便,简化了各序列名称,如以 Hymo01 代替 Hymo-UA * 01,依此类推。故图 3 中 68 条序列的名称为 Hymo01 ~ Hymo68。从图 3 可以看出,来自各群体的等位基因并未按群体进行聚类,而是混杂聚类并主要构成分支 I 和分支 II,支持率分别为 0.87 和 0.63。不过,图中仍然有几个支持率很高(0.99 ~ 1.00)且主要由 YZL、MIS 或 DAN 群体的序列构成的小分支。分支 I 的 42 个序列间的相似度为 53.7% ~ 97.2%,分支 II 的 26 个序列间的相似度为 67.3% ~ 99.5%;分支 I 和 II 序列间的遗传距离为 0.571 5,它们的氨基酸多样性指数分别为 $0.273 4 \pm 0.133 7$ 、 $0.057 1 \pm 0.029 6$ 。可见,分属于两个分支内的等位基因间的差异很大。同时,在研究中发现 YZL、DAN、MIS 群体分别有 1、4 和 1 个体含有 3 个不同的等位基因,分属于分支 I 和分支 II。这些结果都表明,鲢 MHC I 类基因应该存在两个基因座,每个基因座含有大量的等位基因。

2.4 选择压力检测

以人类 HLA-A2 类分子的晶体三维结构^[26]为参照,对鲢 MHC I 类 α_2 结构域基因的抗原结合区(PBR)进行推测,并通过在线生物软件工具

Datamonkey^[28]来验证 PBR 的确切位置。结果表明 PBR 的 16 个氨基酸中,有 13 个存在变异(81.25%);而非抗原结合区(non-PBR)的 60 个氨基酸中,变异位点数为 43 个(71.67%)。PBR 区的变异率要比 non-PBR 区高出约 10%。经计算(表 4),3 群体总的 ω 值(0.900 8 ~ 0.979 6)及 non-PBR 区的 ω 值(0.736 7 ~ 0.855 7)均小于 1;而 PBR 区 ω 值大小顺序为 YZL(1.652 5) > MIS(1.499 5) > DAN(1.337 0),都大于 1,表明 PBR 区受到正向选择(positive selection)压力的作用。

利用 CODEML 中的模型 M1a 和 M2a、M7 和 M8 分别对鲢 MHC I 类分子进行选择压力检验(计算结果未列出),发现 M2a、M8 模型为最适模型,相关检验参数见表 5。通过 PAML 软件中的经验贝叶斯法,在模型 M2a 和 M8 中共检测到 6 个正向选择位点(113、114、143、152、154 和 157),除 113 位点外,其余 5 个位点均位于 PBR 区内,再次证明鲢 MHC I 类 α_2 结构域受到正向选择压力的作用。

3 讨论

3.1 鲢群体间 MHC I 类基因多态性及选择压力差异

研究表明,鱼类 MHC I 类分子同样具有高度多态性。WANG 等^[29]从匙吻鲟(*Polyodon spathula*)和中国白鲟(*Acipenser sinensis*)的 10 尾个体中,发现 12 个 MHC I 类的等位基因;AOYAGI 等^[27]从 9 尾虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中,扩增出 10 个 MHC I 类基因等位基因。本研究中,我们从鲢 YZL、DAN、MIS 群体各 12 ~ 15 尾样本中,分别获得 20 ~ 27 个不同 MHC I 类等位基因,且核苷酸和氨基酸序列的变异范围(39% ~ 99%)很大,显示出较丰富的多态性。比较而言,DAN 群体的样本数(12)和测序有效克隆数(35)最少,测得的等位基因数却最多(27),表明该群体的多态性最为丰富。历史上,多瑙河流域的鲢引种于源前苏联或中国^[2,9],引种次数多、群体数量较大,显然不同地理种群间的杂交增加了该流域鲢的遗传多样性。而美国密西西比河流域(MIS 群体)的鲢引种来源不明,最初亲本数量有限,来源较为单一且存在奠基者效应^[2,9],其 MHC I 类基因多态性较 DAN 群体稍低不难理解

(表 2)。MIS 群体在建群过程中的奠基者效应可能导致遗传漂变作用的产生,而遗传漂变往往伴随瓶颈效应。从遗传学角度看,瓶颈效应的加剧会导致单倍型多样度的降低,继而造成物种适应能力的下降^[30]。有观点认为,遗传多样性的高低与一个物种的适应能力、生存能力及进化潜能密

切相关^[31]。由此推测,生活于密西西比河流域的鲢种群,在适应新环境的过程中,通过基因与环境互动,不断积累有利变异,增加与适应性密切相关的 MHC 基因的多态性,以利于物种的生存与繁衍。

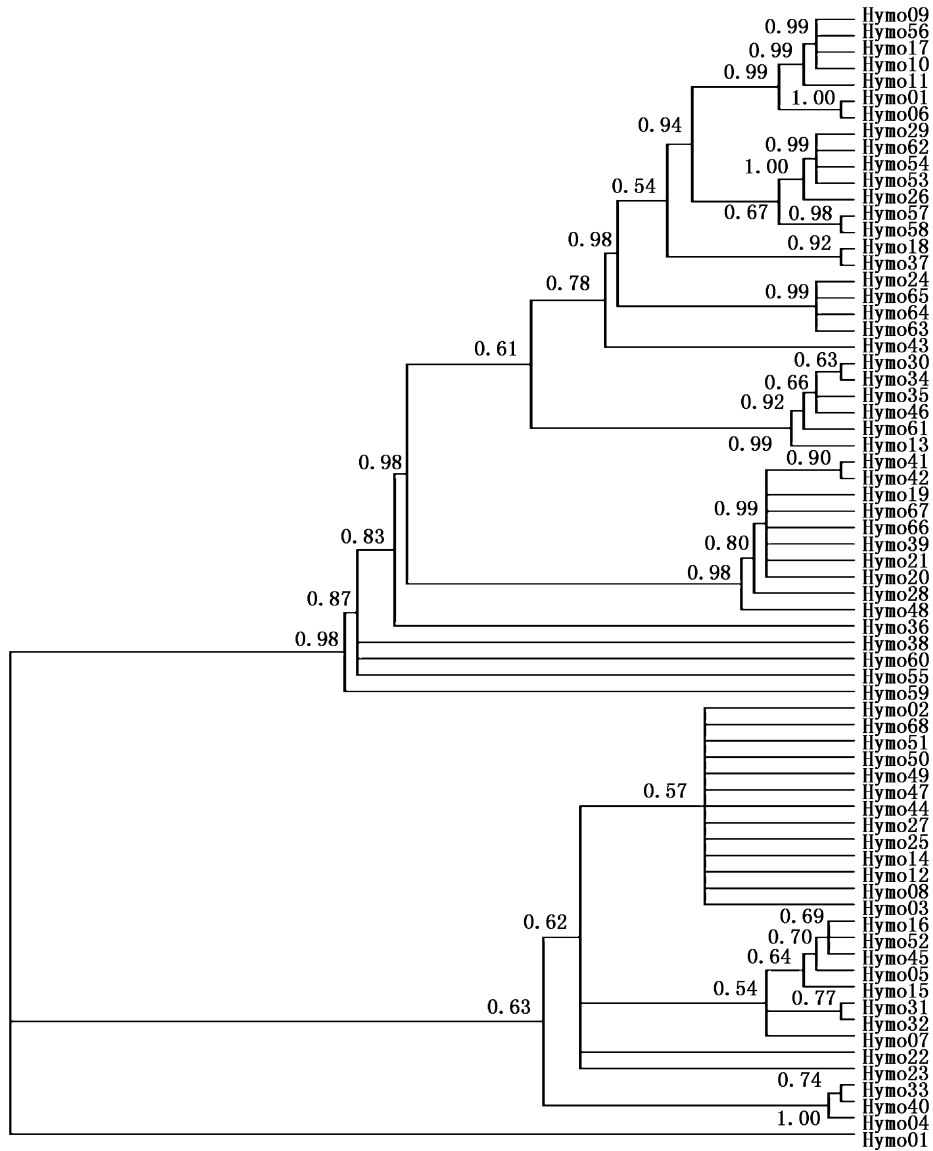


图 3 由鲢 MHC I α_2 结构域氨基酸序列所构建的贝叶斯群体系统关系树

Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree of the MHC class I α_2 domain based on the amino acid sequences of silver carp

令人吃惊的是,YZL 群体的样本数(15)和测序有效克隆数(45)在 3 群体中都最多,但 MHC I 类等位基因却与 MIS 群体的(21)相当,从而显示出 MHC I 类基因多态性有降低的趋势,这一现象令人担忧。YZL 群体的采样点位于湖北监利

县的老江河,该处为 1991 年农业部在此建立的“长江水系四大家鱼种质资源天然生态库”,每年 5~6 月份发苗季节,从附近江段捞取“江花”,在泥池中培育成鱼种后,年底投入水体自然培育而成^[3]。2009 年,于红霞等的研究表明,老江河鲢

在渐近体长等 3 个参数方面,已经较 20 世纪 80 年代的发生了一些改变,这种生长性能上发生的变化,可能与环境差异、过量捕捞等因素相关^[3]。与此类似,本研究中,YZL 群体 MHC I 类等位基

因数量相对于国外移居群体有下降的趋势,或许与过度捕捞导致的种群数量减少、种群遗传多样性降低等因素有关,不过仍需通过大样本(30 以上)的验证。

表 4 3 群体 PBR 和非 PBR 区的同义替代率和非同义替代率及 ω 值($\omega = d_N/d_S$)

Tab. 4 Relative frequency of synonymous and non-synonymous substitutions in the putative peptide binding region (PBR) and non-peptide binding region (non-PBR) among the three populations

种群	Region	Site	$d_N \pm SE$	$d_S \pm SE$	d_N/d_S	P 值
YZL	ALL	76	0.336 0 \pm 0.052 0	0.373 0 \pm 0.064 0	0.900 8	0.293 1
	PBR	16	0.951 2 \pm 0.124 9	0.575 6 \pm 0.127 1	1.652 5	0.005 8
	non-PBR	60	0.243 2 \pm 0.043 6	0.330 1 \pm 0.073 2	0.736 7	0.112 2
DAN	ALL	76	0.273 6 \pm 0.041 0	0.285 7 \pm 0.046 1	0.957 6	0.403 4
	PBR	16	0.586 4 \pm 0.13 16	0.438 6 \pm 0.137 9	1.337 0	0.053 1
	non-PBR	60	0.212 1 \pm 0.036 6	0.249 5 \pm 0.048 0	0.850 1	0.239 3
MIS	ALL	76	0.399 1 \pm 0.060 6	0.407 4 \pm 0.070 4	0.979 6	0.455 9
	PBR	16	0.957 1 \pm 0.134 1	0.638 3 \pm 0.128 8	1.499 5	0.031 5
	non-PBR	60	0.311 2 \pm 0.054 5	0.363 7 \pm 0.076 3	0.855 7	0.246 3

注:标准误由自展法 1 000 重复计算所得,P 为 Z 检验结果。

表 5 鲢 MHC I 类 α_2 结构域最适选择模型检验参数

Tab. 5 Summary of test statistics for the likelihood-ratio tests of MHC I α_2 domain in the three populations of silver carp

种群	模型比较	自由度 df	统计值	统计意义
YZL	M1a vs. M2a	2	12.584	$P < 0.01$
	M8 vs. M7		12.010 4	$P < 0.01$
DAN	M1a vs. M2a	2	36.028 4	$P < 0.01$
	M8 vs. M7		34.170 2	$P < 0.01$
MIS	M1a vs. M2a	2	13.286	$P < 0.01$
	M8 vs. M7		12.032	$P < 0.01$

先前的许多研究表明,若 MHC 分子的非同义碱基替换(d_N)与同义碱基替换(d_S)的比值($\omega = d_N/d_S$)大于 1,表明它受到正向选择压力的作用^[10,12,27,29,32]。本研究中,鲢 3 个群体 MHC I 类基因 α_2 结构域的 PBR 区的 ω 值都大于 1,检测到的 6 个正向选择位点中的 5 个位于 PBR 区,都证实了正向选择压力的存在。特别是 YZL 群体,其 PBR 区的 ω 值(1.6525)和核苷酸/氨基酸多样性指数(0.2611/0.3523)在 3 群体中为最大,都揭示它受到的选择压力最高。结合生长表型和线粒体基因的研究结果^[2,9],我们发现,近 30 多年来长江流域两岸经济的快速发展,城市规模的扩大、环境污染的加剧、长江中上游大型水利工程的建设及过度捕捞等因素,给栖息于长江流域的鲢天然群体高强度的选择压力,使得它们从表型到分子水平上,都呈现出一定程度的变异。

比较而言,MIS 群体栖息于不同于长江流域的水体,自然环境差异明显,当地居民没有消费鲢的习惯,它可以在密西西比河流域自然繁衍,因此,受到的选择压力最小,这从核苷酸/氨基酸多样性指数(0.1921/0.2621)最低也可证明。针对上述现象,如何采取合适的措施,从根本上遏制长江鲢天然资源衰退的问题,值得相关部门重视。

3.2 群体间遗传分化

最近几年,陆续有研究者从分子水平上探讨鲢国内土著群体与国外移居群体间的遗传差异,但结论并不完全一致。AFLP 的分析表明^[2],鲢中国土著群体内、土著群体与国外移居群体间均分化显著($P < 0.01$);线粒体 COI 和 D-loop 区基因的分析结果却显示^[9],长江群体与多瑙河(DAN)群体的分化不明显($P > 0.05$),却与密西西比河(MRB)群体存在极显著的遗传分化($P < 0.01$),而 DAN 与 MRB 群体间的分化也极显著($P < 0.01$)。本研究发现,无论是 3 个群体间还是 YZL 群体与国外移居群体(DNA 和 MIS)间,都存在明显的遗传分化($P < 0.05$)。这与 AFLP 的分析结果一致,却与线粒体 DNA 的分析结果稍有出入。显然,不同的分析方法及分析的目的基因不同造成了上述结果的差异。同时,也再次证明,MHC 基因的变异可以反映基因组的变异,为水产动物群体遗传结构分析的良好分子标记^[10,12-14]。

在群体间亲缘关系上(图 2),DAN 群体与

YZL 的关系较近,而 MIS 群体与 YZL 的关系则较远。这与 AFLP 的分析结果一致。历史上,DAN 和 MIS 群体的引种来源不同^[2,9],可能是造成它们与 YZL 群体亲缘关系远近的原因。

DUANE CHAPMAN 和 JENEY ZSINMOND 博士等协助采样,2006 级水产养殖专业的胡巧凤、王丹婷、王淑娇 3 位本科生参与部分试验,2008 级硕士生马晓茜和 2009 级硕士生周陆、许丽花等在数据处理上给予了帮助,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 李思发,吴力钊,王强,等. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990.
- [2] 严骏骢,赵金良,李思发,等. 鲢中国土著群体与海外移居群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 水产学报,2010,34(5):673-679.
- [3] 于红霞,唐文乔,李思发. 长江老江河国家及四大家鱼原种场鲢的生长特征[J]. 动物学杂志,2009,44(2):21-27.
- [4] 赵金良,李思发. 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼种群分化的同工酶分析[J]. 水产学报,1996,20(2):104-110.
- [5] 张锡元,张德春,杨代淑,等. 长江鲢遗传多样性的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 水产学报,1999,23(s1):7-14.
- [6] 朱晓东,耿波,李娇,等. 利用 30 个微卫星标记分析长江中下游鲢群体的遗传多样性[J]. 遗传,2007,29(6):705-713.
- [7] 王长忠,梁宏伟,邹桂伟,等. 长江中下游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传,2008,30(10):1341-1348.
- [8] 王淞,曹晓霞,谷口顺彦,等. 4 个群体鲢 mtDNA D-loop 的 PCR-RFLP 分析[J]. 淡水渔业,2010,40(4):3-15.
- [9] LI S F, XU J W, YANG Q L, et al. Significant genetic differentiation between native and introduced silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) inferred from mtDNA analysis [J]. Environmental Biology of Fishes, 2011,92(4):503-511.
- [10] KIM T J, PARKER K M, HEDRICK P W. Major histocompatibility complex differentiation in Sacramento River Chinook Salmon [J]. Genetics, 1999,151(3):1115-1122.
- [11] VASSILAKOS D, NATOLI A, DAHLHEIM M, et al. Balancing and directional selection at exon-2 of the MHC DQB1 locus among populations of *Odontocete cetaceans* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2009,26(3):681-689.
- [12] MILLER K M, WITHLER R E, BEACHAM T D. Molecular evolution at MHC genes in two populations of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. Molecular Ecology, 1997,6:937-954.
- [13] 蔡完其,轩兴荣,王成辉,等. 红鲤 4 群体间主要组织相容性复合体的差异[J]. 水产学报,2003,27(2):113-118.
- [14] 刘至治,蔡完其,李思发. 中华鳖群体间编码 MHC I 类分子 α_2 结构域基因的克隆及序列分析[J]. 水产学报,2006,30(2):197-203.
- [15] 夏春. 白鲢 MHC I α_2 基因克隆和序列分析[J]. 动物学报,1999,45(3):345-349.
- [16] ANMARKRUD J A, JOHNSEN A, BACHMANN L, et al. Ancestral polymorphism in exon 2 of bluethroat (*Luscinia svecica*) MHC class II B genes [J]. Evolutionary Biology, 2010,23(6):1206-1217.
- [17] KLEIN J, BONTROP R E, DAWKINS R L, et al. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species; a proposal [J]. Immunogenetics, 1990,31:217-219.
- [18] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999,41:95-98.
- [19] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997,25(24):4876-4882.
- [20] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary bioinformatics online, 2005, 1:45-47.
- [21] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007,24(8):1596-1599.
- [22] HUELSENBECK J, RONQUIST F. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003,19(12):1572-1574.
- [23] YANG Z H. PAML4: phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24:1586-1591.
- [24] YANG Z H, NIELSEN R, GOLDMAN N, et al. Codon substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites [J]. Genetics 2000,155:431-449.
- [25] YANG Z H, WONG W S W, NIELSEN R. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection [J]. Molecular Biology and Evolution, 2005, 22:1107-1118.
- [26] PEDRO A R, REINHERZ E L. Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms [J]. Molecular Biology, 2003,331:623-641.
- [27] AOYAGI K, DIJKSTRA J M, XIA C, et al. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Immunology, 2002, 168:260-273.
- [28] SERGEI L K P, SIMON D W F. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection [J]. Molecular Biology and Evolution, 2005, 22

- (5):1208 – 1222.
- [29] WANG D Q, ZHONG L, WEI Q W, et al. Evolution of MHC class I genes in two ancient fish, paddlefish (*Polyodon spathula*) and Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. FEBS Letters, 2010, 584:3331 – 3339.
- [30] 唐首杰, 李思发, 蔡完其. 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[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3):483 – 492.
- [31] 曾珍, 刘至治, 潘连德, 等. 松江鲈鱼野生群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化[J]. 动物学研究, 2012, 33(2):203 – 210.
- [32] MCCLELLAND E K, MING T J, TABATA A, et al. Sequence analysis of MHC class I α_2 from sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31:501 – 510.

The analysis of genetic variation among Yangtze River and introduced populations from America and Hungary of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by Major Histocompatibility Complex (MHC)

FENG Wei¹, LIU Zhi-zhi¹, LI Si-fa², LI Xue-song¹, TANG Wen-qiao¹, YANG Jin-quan¹

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) class I α_2 domain was used to study the genetic variation among Yangtze River-Laojianghe (YZL), introduced Danube River (DAN) and Mississippi River (MIS) populations of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). A total of 68 different nucleotide sequences were got from 117 clones in 40 individuals of the three populations. The major results were as follows: (1) 21, 27 and 20 alleles were detected in the YZL, DAN and MIS populations respectively and the wide range of nucleotide (54.1% – 99.5%) / amino acid (39.4% – 98.6%) sequence similarities indicated relatively high polymorphism of MHC class I α_2 domain of silver carp in the three populations. (2) The range of mean nucleotide / amino acid sequence similarities was MIS > DAN > YZL, but on the contrary, the nucleotide / amino acid diversity index (π/π_{aa}) was YZL > DAN > MIS. So, it was concluded that YZL population had higher variation than the other two populations. (3) The AMOVA results, based on the amino acid sequences, indicated that there existed significant genetic differentiation whether among the three populations or between native and introduced populations ($P < 0.05$). (4) The ω values of non-synonymous / synonymous nucleotide substitution were YZL(1.652 5) > MIS(1.499 5) > DAN(1.337 0) > 1, and five positive selection sites were detected in the peptide binding region (PBR), indicating positive selection pressure on the three MHC class I α_2 domain of silver carp with the highest selection pressure on the YZL population.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; genetic diversity; MHC; introduced population