

李兆薇, 宋 阳, 徐永福, 等. 基于微卫星标记的养殖牛蛙群体遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(12): 2409-2417.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.12.013

基于微卫星标记的养殖牛蛙群体遗传多样性分析

李兆薇¹, 宋 阳¹, 徐永福², 胡亚洲¹, 华瑞云³, 王子奥⁴, 曹文韬¹, 梁艺馨¹,
王晓清¹, 秦 溱¹

(1. 湖南农业大学水产学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省水产研究所<湖南省水产原种场>, 湖南 长沙 410153; 3. 湖南雪晖
生物科技有限公司, 湖南 长沙 410100; 4. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南 长沙 410127)

摘要: 为了解中国不同地区牛蛙(*Aquarana catesbeiana*)养殖群体的遗传结构特点, 利用8个多态性较好的微卫星位点, 对5个牛蛙养殖群体(湖南省岳阳市湘阴县、湖南省长沙市长沙县、福建省漳州市东山县、广东省湛江市遂溪县、湖北省荆州市监利县)的遗传多样性进行分析。在160个样本中共检测到96.000 0个等位基因, 开发的8个微卫星位点中有5个微卫星位点具有高度多态性。5个群体的观测等位基因数(N_a)为6.625 0~9.250 0个, 有效等位基因数(N_e)为3.351 4~4.525 4个, 观测杂合度(H_o)为0.504 2~0.562 5, 期望杂合度(H_e)为0.599 9~0.675 0, 多态性信息含量(PIC)为0.564 9~0.649 1, 表明各养殖群体均具有较高多态性。5个群体间的遗传分化指数(F_{st})为0~0.049 2, 基因流(N_m)为4.829 6~9 999.000 0, 说明群体间的基因交流频繁。分子方差分析(AMOVA)结果显示, 种群间的变异率仅为2%, 种群内变异占总变异的98%。由结果可以看出, 各牛蛙养殖群体具有较高的遗传多样性, 遗传分化水平较低, 基因流较大, 群体间的遗传距离较近, 存在等位基因分布不均、杂合子缺失的情况, 若继续进行近缘交配, 而不进行科学的良种繁育工作, 将存在较大的种质退化风险。

关键词: 牛蛙; 微卫星; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: S966.3⁺¹ 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)12-2409-09

Analysis of genetic diversity in farmed bullfrogs based on microsatellite markers

LI Zhaowei¹, SONG Yang¹, XU Yongfu², HU Yazhou¹, HUA Ruiyun³, WANG Zi'ao⁴, CAO Wentao¹,
LIANG Yixin¹, WANG Xiaoqing¹, QIN Qin¹

(1. College of Fisheries, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Fisheries Research Institute and Aquatic Products Seed Stock Station, Changsha 410153, China; 3. Hunan Xuehui Biotechnology Co., Ltd., Changsha 410100, China; 4. Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, China)

Abstract: To reveal the genetic structure of cultured bullfrog (*Aquarana catesbeiana*) populations across different regions of China, we used eight highly polymorphic microsatellite loci to analyse the genetic diversity of five farmed populations from Xiangyin County (Yueyang, Hunan), Changsha County (Changsha, Hunan), Dongshan County (Zhangzhou, Fujian), Suixi County (Zhanjiang, Guangdong) and Jianli County (Jingzhou, Hubei). A total of 96.000 0 alleles were detected in 160 individuals, and five of the eight newly developed microsatellite

loci showed high polymorphism. Across the five populations, the mean number of alleles per locus (N_a) ranged from 6.625 0 to 9.250 0, effective allele numbers (N_e) from 3.351 4 to 4.525 4, observed heterozygosity (H_o) from 0.504 2 to 0.562 5, expected heterozygosity (H_e) from 0.599 9 to 0.675 0, and polymorphism information content

收稿日期: 2025-06-30

基金项目: 湖南省种业创新项目(2023); 湖南农业科技创新基金项目(2025CX52)

作者简介: 李兆薇(1999-), 女, 山东邹城人, 硕士, 研究方向为水产动物遗传育种。(E-mail) 610546934@qq.com

通讯作者: 王晓清, (E-mail) wangxiao8258@126.com

(*PIC*) from 0.564 9 to 0.649 1, indicating high polymorphism in all cultured groups. The genetic differentiation index (*F_{st}*) among the five populations ranged from 0 to 0.049 2, and gene flow (*N_m*) estimates varied between 4.829 6 and 9 999.000 0, reflecting frequent gene exchange. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that only 2% of the total genetic variation was attributable to differences among populations, whereas 98% resided within populations. These results demonstrate that the cultured bullfrog populations retain high genetic diversity and low genetic differentiation, with close genetic distances and strong gene flow. Nevertheless, uneven allele distribution and heterozygote deficiency were observed. If inbreeding continues without scientific selective breeding, a substantial risk of germplasm deterioration is expected.

Key words: *Aquarana catesbeiana*; microsatellite; genetic diversity; genetic differentiation

牛蛙(*Aquarana catesbeiana*)隶属于两栖纲(Amphibia)、无尾目(Aunra)、蛙科(Ranidae)、蛙属(*Rana*)^[1],其生长速度快、个体较大、适应性强、养殖成本较低。作为一种食材,牛蛙营养丰富,具有高蛋白质含量、低脂肪含量、低胆固醇含量等特点^[2],并且含有人类必需的多种氨基酸^[3]。此外,蛙皮中含有大量生物胺与活性多肽^[4-5]。由此可见,牛蛙是中国一种重要的水产品^[6-7]。中国自从 1959 年首次从古巴引入牛蛙以来,分别将其放养于福建、湖南、天津等地,未进行人工养殖。1980 年起,人们用湖南省常德市汉寿县发现的牛蛙开展人工繁养并取得成功;20 世纪 90 年代起,牛蛙养殖在中国南方多个省份得以推广,随后辐射至全国,牛蛙产量呈暴发式增长。目前,中国广东、福建、广西、湖南、湖北、江西等地均有牛蛙养殖产业^[8-9]。虽然目前中国的牛蛙养殖产业仍不断发展,但牛蛙种源仍是最早的古巴牛蛙,未引进过其他原种,并且几十年来未进行过种质的更新,使得目前亲本退化、苗种质量下降、抗病能力降低等问题日益严重^[10]。与蛙类遗传多样性有关的报道有棘胸蛙^[11]、中国虎纹蛙^[12]、东北林蛙^[13]等,而与牛蛙相关的研究较少,如 Wang 等^[14]用微卫星标记研究陆地与岛屿野生牛蛙群体的遗传进化情况,Zhang 等^[15]利用简单重复序列(SSR)和单核苷酸多态性(SNP)2 种分子标记比较了中国牛蛙和美国牛蛙的遗传多样性,分析了中国人入侵牛蛙的遗传多样性变化。目前,有关养殖牛蛙的种质评估及遗传分析的研究较少。随着牛蛙养殖业的规范化发展,进行牛蛙种质创新、建立良种生产体系以解决行业难题等问题迫在眉睫^[16],开展中国养殖牛蛙种质及遗传相关研究,对于进一步了解牛蛙的遗传多样性、提高牛蛙苗种生产质量、促进牛蛙产业发展具有重要意义。

随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、限制性片段长度多态性(RFLP)、扩增片段长度多态性(AFLP)、SSR 等分子标记技术自发明以来就被广泛应用于水产动物遗传研究等方面。SSR 标记相对比

较保守,引物序列具有高度特异性,且多态性丰富,能更深入准确地揭示物种的遗传结构、遗传分化程度,被认为是种质鉴定、遗传多样性评估的优良分子标记^[17-18],被广泛应用于水产动物群体遗传多样性的分析^[19],如黑鲈^[20]、三角鲂^[21]、克氏原螯虾^[22]、尼罗罗非鱼^[23]、鲢^[24]等。有关牛蛙方面的研究工作主要集中在养殖技术^[25]、染色体^[26]、同工酶^[27-28]、生长^[3]及病害防治^[29]等多个方面,有关种质遗传方面的研究较少。本研究开发了牛蛙的微卫星标记,基于此对 5 个不同地区牛蛙养殖群体开展遗传多样性的研究,以期评估牛蛙种质状况、遗传资源保护利用和牛蛙良种良育等工作提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样本采集地区分别为湖南省岳阳市湘阴县(XY)、湖南省长沙市长沙县(CSX)、福建省漳州市东山县(FJ)、湖北省荆州市监利县(HB)、广东省湛江市遂溪县(GD),各采集 32 只共 160 只养殖牛蛙样本,所有地区的样本均按照雌、雄各半的方式采集。分别剪取每只牛蛙的腿部肌肉 1 g,置于 90% 无水乙醇中,于 -20 °C 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 微卫星标记的筛选 提取脱氧核糖核酸(DNA)并检测无误后,于 -20 °C 保存备用。在各地区的 32 个样本中随机选取 10 只牛蛙(雌雄比例为 1:1)的肌肉组织样本(5 个地区共有 50 个样本),交由上海派诺森生物科技公司进行简化基因组测序。按照双酶切限制性位点关联 DNA(Double digest restriction site-associated DNA sequencing, ddRAD)测序方式进行建库,用二代测序技术对文库进行双末端测序,根据简化基因组检测结果,使用微卫星识别工具(Micro satellite identification tool, MISA)在所有序列中对微卫星位点进行检索。

1.2.2 引物及 PCR 反应体系的设计 用 Primer3 v2.3.6 对上述搜索到的多态性>2 的基因簇(Cluster)内的 SSR 序列进行引物的批量设计,并按照如下方法对引物进行筛选:(1)设计引物类型为非单核苷酸重复模体、非复合重复模体,仅选取每条读长(Read)上有 1 个 SSR 的 SSR 类型设计引物;(2)引物必须在某个 Cluster 内,且 Cluster 内 SSR 的长度多态性 ≥ 2 ;(3)每条引物在 Cluster 中必须有 2 条不同的 Read 同时覆盖该 SSR 位点,并支持在该位置设计引物;(4)去除完全相同的引物结果。

在设计引物中随机挑选 50 对引物进行初筛,在 5 个不同地区的牛蛙 DNA 样本中各随机选取 1 个牛蛙个体基因组 DNA,等量混匀后将其作为混合 DNA 模板,用于后续研究。利用随机挑选并合成的 50 对引物,以混合 DNA 为模板进行 PCR 扩增。聚合酶链式反应(PCR)产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,以条带是否清晰完整、基本无引物二聚体、大小与预期结果一致为标准进行引物质量检测。将符合条件的引物用于下一步的 PCR 扩增,并基于此确定最适退火温度。在经过初筛的引物 5' 端添加荧光标记羧基荧光素(FAM),对 160 个样本 DNA 进行 PCR 扩增。20.0 μL PCR 反应体系为:10.0 μL 2 \times Taq PCR 混合物,0.5 μL 模版 DNA,各 0.5 μL 上下游引物,8.5 μL 双蒸水(ddH_2O)。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,最适退火温度 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存产物^[30-31]。产物检测合格后,送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行基因分型。

1.2.3 数据统计与分析 用 Gene Mapper 4.1 对峰图进行分析。对于峰图中信号值在 400 以上、在同一个位点可以检测到其他相似峰型且无其他杂峰干扰的数据予以采纳。用 160 个样本数据建立数据矩阵,用于后续分析。

遗传多样性分析。用 Popgen 32、GenAlEx version 6.501 软件^[32]分析各项遗传多样性指标,包括观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、遗传分化指数(F_{st})等^[33],综合判断不同地区牛蛙的遗传多样性。

遗传结构分析。根据 Evanno 等^[34]的方法计算最适 K 值,判断 5 个种群的来源。使用非加权组平均法(UPGMA)建立群体的聚类树。使用贝斯模型,基于 Structure version 2.3.3 软件分析群体的遗传结构。

分子方差分析与基因流的估算。基于以上分析结果,参照文献^[31]的方法计算各群体间和群体内

的变异、分化情况并进行显著性检验^[35]。用 Genetix 计算群体间的遗传分化指数、基因流。

2 结果与分析

2.1 微卫星筛选与引物多态性检测

得到下一代 DNA 测序技术(Next generation sequencing, NGS)测序数据后,通过数据质控处理进行过滤,获得 106 243 706 条高质量 Read,占原始 Read 的 99.16%;高质量 Read 的碱基数为 15 294 651 631 个,占原始碱基总数的 99.13%。结果显示,质控后的测序结果具有较高的质量[质量数大于 20 的碱基所占百分比(Q_{20}) $\geq 98.40\%$,质量数大于 30 的碱基所占百分比(Q_{30}) $\geq 95.92\%$],G+C 含量为 41.28%,数据质量符合要求。

在文库的所有序列中搜索 SSR 位点,共搜索到 1 976 087 个 SSR,其中以复合形式存在的 SSR 数量为 266 298 个。在搜索结果中随机挑选 50 个 SSR 标记用于设计引物,从而进行初筛。从 50 对引物中初步筛选出能获得清晰、完整、无二聚体的产物,且条带大小与预期结果一致的 18 对引物。在初筛的 18 对引物的 5' 端添加荧光标记(FAM),用已经添加了荧光标记的引物分别与所有牛蛙样本个体进行 PCR,产物经检测无误后进行分型。最终获得多态性高、峰形较好的 8 对引物,引物具体信息见表 1。

表 1 用于本研究的微卫星引物相关信息

Table 1 Microsatellite primers used in the present study

位点	重复序列	引物序列(5'→3')	退火温度($^{\circ}\text{C}$)
YG08	(TCTA) ₁₉	F:GATTCAACGTGATGACACG R:GCCTTGAGGAATGGAGTTGA	58
YG10	(TATC) ₁₅	F:AGGACTTGACACAGCTGACCT R:AAGGAGATCCGCAATCACAG	58
YG11	(TA) ₂₃	F:CAATGTAAATGTGCGGCTTG R:TAGCATTITTTGGCTGAGGCT	58
YG15	(TTA) ₁₆	F:CCCATGTTACACAGTTCTCC R:GATTGGGAGAGTGAAGTTCCA	58
YG20	(TGTA) ₅	F:TCAAAGTGTCTTGGGCGG R:ACCTACCTTCTGTTTGGGC	58
YG36	(TTCTA) ₁₀	F:GTCTTGTAGCCCATTCCAGC R:CTGATTTCTTCCAAGACTGTG	58
YG37	(ATT) ₁₂	F:GCCTATGTCCAGGAACGTGT R:GCTTGAGAACTATTCATTCAGG	58
YG50	(TAT) ₁₄	F:CTCTAATGCCCCACCACAGT R:CCAAGAAATCCCAGAGGACA	58

检测结果表明,160 个样本中共检测到96.000 0 个等位基因。由表 2 可以看出,YG-50 的观测等位基因数最少,只有7.000 0个,YG-8、YG-10 的观测等位基因数最多,均为17.000 0个,各位点的平均观测等位基因数为 12.000 0 个。有效等位基因数在 1.742 6个(YG-37)和8.988 8个(YG-10)之间。各个位点的有效等位基因数平均值为4.104 0个,不同个体间的等位基因数有一定差异。香农指数(I)在 0.971 7(YG-37)和2.429 1(YG-10)之间,平均值为 1.554 8。用多态性信息含量(PIC)值来判断 SSR 位

点的多态性,结果显示,所选位点的 PIC 值在 0.408 1(YG-37)和0.878 9(YG-10)之间,平均值为 0.636 1,均大于0.250 0,具有较高的多态性,可以用于后续研究。具有高度多态性($PIC \geq 0.500 0$)的位点有 YG-8、YG-10、YG-11、YG-20、YG-50;具有中度多态性($0.250 0 \leq PIC < 0.500 0$)的位点有 3 个,分别为 YG-15、YG-36 和 YG-37。观测杂合度在 0.287 5(YG-37)和 0.925 0(YG-10)之间,期望杂合度在 0.427 5(YG-37)和 0.891 5(YG-10)之间,平均值分别为 0.537 7、0.665 8。

表 2 微卫星位点的遗传多样性参数

Table 2 Genetic diversity parameters for the microsatellite loci

位点	观测等位基因数 (个)	有效等位基因数 (个)	香农指数 (I)	多态性信息含量 (PIC)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	哈迪-温伯格 平衡指数
YG-8	17.000 0	7.076 7	2.188 3	0.843 7	0.856 2	0.861 4	0***
YG-10	17.000 0	8.988 8	2.429 1	0.878 9	0.925 0	0.891 5	0.008 2**
YG-11	12.000 0	4.430 6	1.740 4	0.743 0	0.343 8	0.776 7	0***
YG-15	11.000 0	1.822 0	1.130 3	0.440 8	0.343 8	0.452 6	0***
YG-20	12.000 0	3.641 8	1.589 5	0.681 7	0.475 0	0.727 7	0***
YG-36	10.000 0	2.031 4	1.113 1	0.477 6	0.425 0	0.509 3	0***
YG-37	10.000 0	1.742 6	0.971 7	0.408 1	0.287 5	0.427 5	0***
YG-50	7.000 0	3.098 0	1.276 1	0.615 1	0.645 6	0.679 4	0.999 7ns

表示极显著偏离($P < 0.01$),*表示极显著偏离($P < 0.001$),ns表示不偏离($P > 0.05$)。

2.2 牛蛙群体的遗传多样性分析

由表 3 可知,牛蛙各群体的观测等位基因数为 6.625 0~9.250 0 个,有效等位基因数为 3.351 4~

4.525 4 个, H_o 为 0.504 2~0.562 5, H_e 为 0.599 9~0.675 0, PIC 为 0.564 9~0.649 1。各群体的 $PIC > 0.500 0$,为高度多态性群体。

表 3 牛蛙群体的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of the bullfrog populations

群体	观测等位基因数 (个)	有效等位基因数 (个)	香农指数 (I)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态性信息含量 (PIC)
CSX	7.000 0	3.708 4	1.399 2	0.562 5	0.652 2	0.616 2
FJ	6.625 0	3.351 4	1.264 6	0.527 3	0.599 9	0.564 9
GD	7.250 0	3.674 5	1.406 2	0.504 2	0.648 7	0.614 6
HB	9.250 0	4.525 4	1.575 1	0.539 1	0.675 0	0.649 1
XY	7.875 0	3.888 5	1.451 5	0.554 7	0.656 4	0.624 8

XY:湖南省岳阳市湘阴县;CSX:湖南省长沙市长沙县;FJ:福建省漳州市东山县;HB:湖北省荆州市监利县;GD:广东省湛江市遂溪县。

2.3 种群遗传变异分析

由表 4 可以看出,GD 和 FJ 牛蛙群体之间的遗传分化指数(F_{st})值最低(0),而 HB 和 CSX 牛蛙群体之间的 F_{st} 值最高(0.049 2),CSX 牛蛙群体与其他 4 个牛蛙群体之间的 F_{st} 值形成局部高点,均大于0.030 0。5 个牛蛙群体之间的 F_{st} 值为0~

0.049 2,平均值为0.023 9,说明 5 个牛蛙群体之间的整体遗传变异不显著,遗传分化程度较低。基因流(N_m)与 F_{st} 值呈负相关,同时 GD 牛蛙群体与 FJ 牛蛙群体之间的 N_m 值最高,为9 999.000 0,而 HB 牛蛙群体与 CSX 牛蛙群体之间的 N_m 值最低,为4.829 6。

表4 群体间的基因流和遗传分化结果

Table 4 Gene flow and genetic differentiation between populations

群体	CSX	FJ	GD	HB	XY
CSX		6.933 1	6.774 3	4.829 6	5.460 9
FJ	0.034 8		9.999.000 0	19.239 3	11.079 2
GD	0.035 6	0		14.023 3	95.256 5
HB	0.049 2	0.012 8	0.017 5		11.957 7
XY	0.043 8	0.022 1	0.002 6	0.020 5	

右上方数据为群体间的基因流(N_m),左下方数据为遗传分化指数(F_{st})。XY:湖南省岳阳市湘阴县;CSX:湖南省长沙市长沙县;FJ:福建省漳州市东山县;HB:湖北省荆州市监利县;GD:广东省湛江市遂溪县。

由表5可以看出,种群间的遗传变异占遗传变异总量的2%,种群内个体间的遗传变异占遗传变异总量的98%。说明5个牛蛙群体的主要变异来自种群内。

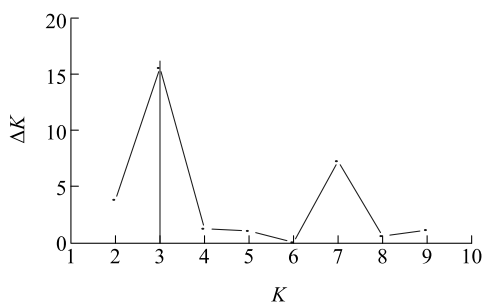
表5 种群分子方差分析(AMOVA)结果

Table 5 Results of molecular variance analysis (AMOVA) of populations

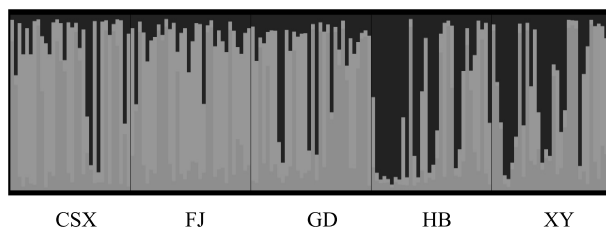
变异来源	自由度	平方和	方差分量	变异百分比(%)
种群间	4	44.494	0.152	2
种群内个体间	155	970.031	6.258	98
总计	159	1 014.525	6.410	100

2.4 群体遗传结构分析

2.4.1 Structure分析 在Structure Selector中根据Evanno等^[34]的方法对5个不同地区牛蛙养殖群体的遗传结构进行分析,设定分组数为1~10,依据群体的亚群数(K 值)与 ΔK 的变化趋势绘制关系图。由图1可以看出,当 $K=3$ 时, ΔK 最大,表明在5个群体中存在3个基因库。 $K=3$ 时5个群体的Structure结果见图2。



K 值:群体的亚群数。

图1 基于Structure分析的 ΔK 方法绘制的 K 值变化情况Fig.1 K -value variation chart drawn by the ΔK method in the analysis of the STRUCTUR

XY:湖南省岳阳市湘阴县;CSX:湖南省长沙市长沙县;FJ:福建省漳州市东山县;HB:湖北省荆州市监利县;GD:广东省湛江市遂溪县。

图2 $K=3$ 时5个群体的Structure结果Fig.2 Population structure of the five groups inferred from STRUCTURE analysis at $K=3$

2.4.2 遗传距离与聚类分析 由表6可以看出,5个牛蛙群体间的遗传距离为0.024 9~0.103 5,遗传相似度为0.901 6~0.975 4,其中CSX牛蛙群体与HB牛蛙群体间的遗传距离最大,为0.103 5,GD牛蛙群体与FJ牛蛙群体间的遗传距离最小,为0.024 9。此外,CSX牛蛙群体与HB牛蛙群体间的遗传相似度最小,为0.901 6;GD牛蛙群体与FJ牛蛙群体间的遗传相似度最大,为0.975 4。根据上述分析结果,构建群体的非加权组平均法(UPGMA)树,由图3可以看出,FJ牛蛙群体和GD牛蛙群体间的遗传距离最近,汇聚成1支,与HB牛蛙群体汇聚后,再与XY牛蛙群体汇聚为1支,最后4个牛蛙群体与独立1支的CSX牛蛙群体汇聚。

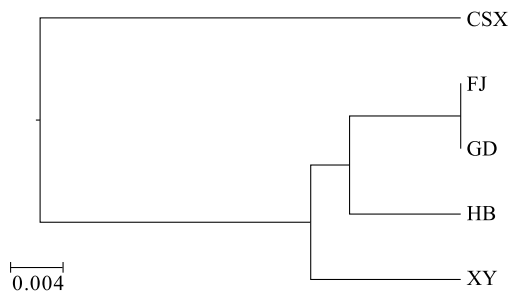
表6 群体间的遗传相似度和遗传距离

Table 6 Genetic identity and genetic distance between populations

群体	CSX	FJ	GD	HB	XY
CSX		0.936 6	0.923 2	0.901 6	0.913 8
FJ	0.065 5		0.975 4	0.958 4	0.949 3
GD	0.079 9	0.024 9		0.941 1	0.961 9
HB	0.103 5	0.042 5	0.060 7		0.937 2
XY	0.090 2	0.052 0	0.038 9	0.064 9	

XY:湖南省岳阳市湘阴县;CSX:湖南省长沙市长沙县;FJ:福建省漳州市东山县;HB:湖北省荆州市监利县;GD:广东省湛江市遂溪县。

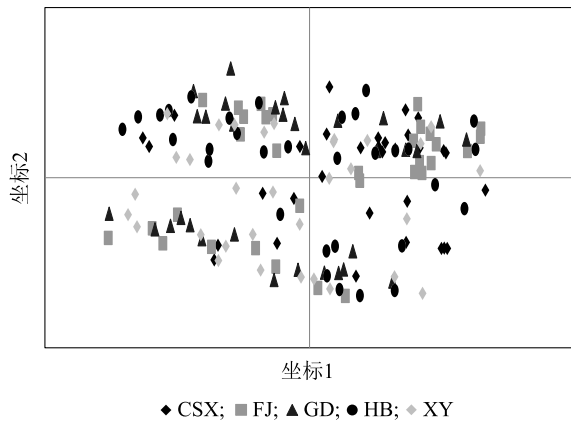
2.4.3 主成分分析 基于Nei氏遗传距离,对160个牛蛙样品进行主成分分析。如图4所示,5种不同图例分别代表5个不同地区的养殖牛蛙样本,5种图例在图中的分布较为均匀,说明5个地区牛蛙样本间的差异性较小,关联性较大,不同种群之间的基因交流较多,没有明显区别。



XY:湖南省岳阳市湘阴县;CSX:湖南省长沙市长沙县;FJ:福建省漳州市东山县;HB:湖北省荆州市监利县;GD:广东省湛江市遂溪县。

图3 5个种群的非加权组平均法(UPGMA)聚类结果

Fig.3 Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering results of five populations



XY:湖南省岳阳市湘阴县;CSX:湖南省长沙市长沙县;FJ:福建省漳州市东山县;HB:湖北省荆州市监利县;GD:广东省湛江市遂溪县。

图4 160个样品的主坐标分析(PCoA)结果

Fig.4 Principal coordinates analysis (PCoA) results of 160 samples

3 讨论

3.1 牛蛙各养殖群体的遗传多样性水平

遗传多样性是物种多样性的基础,物种和种群的遗传多样性决定了物种对环境的适应能力。分析物种的遗传多样性,可以从本质上了解物种的变异、进化情况,并可以评估物种的种质资源^[36]。已有的基于微卫星数据对群体遗传多样性的分析中,常通过等位基因数、杂合度和多态性信息含量等指标来评价群体遗传多样性^[37]。在本研究中,8个微卫星位点的PIC值全部大于0.2500,其中有5个高度多

态性位点,3个中度多态性位点,符合位点遗传多样性的分析要求。

杂合度是衡量个体或种群中基因的不同形式的比例,可以很好地反映遗传多样性水平,可用于推测物种或种群的基因流动性,帮助分析种群的遗传结构和演化历史^[38]。杂合度较高,意味着群体的同质性较低,种群具有更高的遗传变异,可以更好帮助物种适应环境变化^[39]。当 H_o 大于 H_e 时,说明杂合子较多,反之则说明杂合子缺失^[40],而近缘交配会使杂合子缺失。2022年魏朝宇等^[11]分析了棘胸蛙的遗传多样性,结果显示, H_o 、 H_e 的平均值分别为0.182、0.589。2024年乔芬等^[12]对中国虎纹蛙的遗传多样性分析结果显示, H_o 、 H_e 分别为0.460、0.582。2017年吕广祺^[13]对东北林蛙的遗传多样性分析结果显示,东北林蛙的 H_o 、 H_e 分别为0.2842、0.6475。在本研究中,牛蛙群体的 H_e 的范围为0.5999~0.6750,而 H_o 的范围为0.5042~0.5625,反映牛蛙的遗传多样性与其他物种相比较。但是,5个群体的遗传相似性较高,差异不明显。根据样本溯源结果,从理论分析角度看,自繁养殖场牛蛙样品的遗传多样性应出现降低趋势,但是由于自我繁育时间较短,对遗传多样性的影响较小,因此并未在数据上得以体现。

等位基因数决定了某一基因座上遗传变异的丰富程度,是构成遗传多样性的基础。种群中某个基因座上的等位基因数越多,表明该基因座上的遗传变异越丰富,在进化过程中该位点的突变活跃程度越高,遗传多样性也越高^[41]。有效等位基因数(N_e)与观测等位基因数(N_s)越接近,物种的等位基因分布就越均匀^[42-43]。在本研究中,观测等位基因数为6.6250~9.2500个,有效等位基因数为3.3514~4.5254个,各个群体中的等位基因数量较多, N_e 与 N_s 的差异均较大,说明所有群体均出现了等位基因数量不均的情况。

3.2 牛蛙养殖群体与野生群体的遗传多样性比较

Wang等^[14]在2019年对3个陆地野生牛蛙群体和14个岛屿野生牛蛙群体的遗传多样性进行了分析,结果表明,3个陆地野生牛蛙种群的期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)分别为0.52~0.56、0.56~0.67;岛屿野生牛蛙群体的期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)分别为0.49~0.73、0.50~0.76;陆地牛

蛙群体的平均观测等位基因数(N_a)为3.78~4.33个,岛屿牛蛙群体的平均观测等位基因数(N_a)为4.22~6.78个。2024年Zhang等^[15]对中国牛蛙、美国牛蛙的遗传多样性分析结果表明,中国野生牛蛙种群的期望杂合度(H_e)和观测杂合度(H_o)分别为 0.57 ± 0.03 和 0.69 ± 0.04 ,观测等位基因数(N_a)为 (4.79 ± 0.43) 个。与上述关于牛蛙遗传多样性的报道相比,本研究所测牛蛙群体的遗传参数都存在期望杂合度(H_e)、观测等位基因数(N_a)整体上升但观测杂合度(H_o)下降的情况,并且早期野生种群的观测杂合度(H_o)等于或高于期望杂合度(H_e)。这通常是非随机交配(如近交)后杂合子过剩的表现,可能由于种群建立时的瓶颈效应和随后的快速扩张。但是,在当前研究的养殖群体中,观测杂合度(H_o)普遍低于期望杂合度(H_e),表明群体中可能存在近交现象,由此导致杂合子数量减少。

从理论上讲,野生牛蛙群体的遗传多样性应略高于养殖群体,但是研究结果显示,养殖群体在 H_e 、 N_a 较高的情况下, H_o 下降,表明产业内跨地区的种源流通有效扩大了群体的遗传基础。但是,较高的 N_a 、 H_e 并非自然恢复的结果,而是由于产业为应对种质退化而进行跨区域人工引种,通过人为干预提高了遗传潜力。然而,从明显降低的 H_o 看出,目前牛蛙养殖中繁殖群体规模过小、选择压力过大和近交现象较为普遍。因此,通过人工引种来扩大群体的遗传基础虽然可以使部分遗传参数提高,但是高强度的人工选择、未进行科学良种繁育和普遍存在的近交现象才是导致中国牛蛙养殖业面临种质退化问题的关键。

3.3 牛蛙养殖群体间的遗传分化

遗传分化指数(F_{st})通常用来判断群体的遗传分化程度,是分析物种遗传结构和进化历史的重要工具^[44]。Balloux等^[45]提出,当 F_{st} 大于0.25时,说明遗传分化程度极大;当 F_{st} 小于0.05时,说明遗传分化程度极小,可以忽略不计;当 F_{st} 为0.05~0.25时,属于中度分化。在本研究中, F_{st} 的平均值为0.0239,说明5个牛蛙养殖群体间的遗传变异不显著,遗传分化程度较低。从分子方差分析结果来看,98%的遗传变异均来自种群内个体间,种群间的遗传变异极小(2%),这与遗传分化指数得出的结果一致。

基因流(N_m)与 F_{st} 呈负相关,两者之前存在一

种动态平衡,基因流能够促进种群间的基因交流,可以降低遗传分化程度。而遗传分化指数则反映了种群间的遗传差异,是基因流作用结果的一种体现。基因流和遗传分化指数之间存在复杂的相互作用,共同影响着种群的遗传结构和进化历程^[46]。5个牛蛙群体间的 N_m 范围为4.8296~9999.0000,表明5个牛蛙群体间基因交流频繁、遗传分化小。导致这一现象的原因主要是牛蛙于20世纪50年代末进入中国,20世纪80年代湖南、福建地区初步尝试养殖牛蛙,之后的21世纪初,全国从福建引种牛蛙并辐射至全国。由于各地的牛蛙养殖时间都较短,加上大部分养殖户没有完全掌握育种技术,选择直接买进蝌蚪后以成蛙卖出,导致全国养殖牛蛙种源流动频繁^[47-48],造成不同地区养殖牛蛙群体没有出现明显遗传分化。

遗传距离反映了不同群体间的亲缘关系,可以很好地体现群体间的遗传结构。其中,湖南省长沙市长沙县和湖北省荆州市监利县牛蛙群体间的遗传距离最大(0.1035),广东省湛江市遂溪县和福建省漳州市东山县牛蛙群体间的遗传距离最小(0.0249)。湖南省长沙市长沙县和湖北省荆州市监利县牛蛙群体间的遗传相似度最小(0.9016),广东省湛江市遂溪县和福建省漳州市东山县牛蛙群体间的遗传相似度最大(0.9754)。UPGMA树结果显示,福建群体与广东群体汇聚后与湖北群体汇聚,然后与湘阴群体汇聚为1支,而长沙县群体则独立为1支。根据5个养殖地区的牛蛙溯源情况,长沙县样本是养殖场自我繁育的第4代,湘阴样本是自我繁育的第3代,福建和广东的牛蛙样本均来源于当地,湖北的牛蛙样本是购买了福建的蝌蚪养成成蛙后进行采集的。由此可见,样本溯源情况与遗传距离基本可以匹配,福建和广东地区间样本的遗传距离较近,遗传相似度较大。

4 结论

本研究通过简化基因组测序开发了部分微卫星分子标记,并利用开发出的多态性较好的SSR标记对中国的不同牛蛙养殖群体进行遗传多样性、遗传结构研究。结果显示,5个养殖群体的遗传多样性较高,遗传分化水平较低,遗传距离较近,等位基因分布不均,杂合度较高,且群体间的基因流值较大,说明牛蛙种质的地域差异不明显,存在较多的近缘

交配现象,牛蛙种质有进一步退化的趋势。研究结果填补了国内关于大范围牛蛙种群遗传学研究的空白,可为牛蛙选种育种、牛蛙种质资源保护提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 马杰,孙菁阳,林翰,等. 广东养殖牛蛙主要细菌病调查及耐药性分析[J]. 现代畜牧科技,2023(7):7-12.
- [2] 刘生平,吴胜林,兰琼. 江西省牛蛙养殖行业授信策略研究[J]. 黑龙江粮食,2024(2):94-96.
- [3] 向述辉,朱波,蔡明浪,等. 发酵饲料对牛蛙生长性能、肌肉营养成分及肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报,2024,36(10):6643-6655.
- [4] 宋雪莹. 蛙皮素抗菌肽 Caerin 2.1 的生物信息分析[J]. 饲料研究,2023,46(24):76-80.
- [5] 韩俊友,乔红伟,赵瑞利,等. 牛蛙(*Rana catesbeiana*)蛙皮抗菌肽基因的克隆、测序及其表达[J]. 中国兽医学报,2007,27(3):399-402.
- [6] 邢根安. 牛蛙的品质特性及贮藏保鲜研究[D]. 重庆:西南大学,2023.
- [7] 任中阳,黄香兰,崔雅清,等. 复合保鲜剂对冷冻牛蛙保鲜效果的影响[J]. 农产品加工,2023(5):1-5,9.
- [8] 周海林,曹文韬,王晓清,等. 牛蛙的人工繁殖及蝌蚪培育技术[J]. 当代水产,2024,49(7):74-76,78.
- [9] 蒙薇. 生态养殖助推牛蛙产业高质量发展[J]. 农村新技术,2024(8):4-7.
- [10] 马杰. 牛蛙源伊丽莎白菌流行情况、生物学特性及致病性研究[D]. 广州:仲恺农业工程学院,2023.
- [11] 魏朝宇,汪小冬,魏秀英,等. 5 个棘胸蛙养殖群体微卫星遗传多样性分析[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2022,40(6):206-214.
- [12] 乔芬,邵伟伟,马力,等. 中国虎纹蛙多碱基重复微卫星位点的多态性[J]. 安徽农业科学,2024,52(7):82-86.
- [13] 吕广祺. 基于微卫星 DNA 和线粒体 *COI* 基因对辽宁地区东北林蛙遗传多样性的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2017.
- [14] WANG S P, LIU C H, WU J, et al. Propagule pressure and hunting pressure jointly determine genetic evolution in insular populations of a global frog invader[J]. Scientific Reports,2019,9(1):448.
- [15] ZHANG J Q, XU C X, WANG S P, et al. Variations in genetic diversity of invasive species *Lithobates catesbeianus* in China[J]. Animals,2024,14(9):1287.
- [16] 冯兴浪. 牛蛙风口,是商机还是“伤机”[J]. 当代水产,2022,47(11):79-81.
- [17] 张洪浩. 基于转录组解析的杂交云石斑鱼生长优势的分子机制研究[D]. 舟山:浙江海洋大学,2023.
- [18] 欧阳苗峰,陈红林,刘峰,等. 红螯螯虾不同养殖群体和选育群体遗传多样性及遗传结构分析[J]. 农业生物技术学报,2024,32(9):2112-2123.
- [19] 范嗣刚,黄皓,王鹏飞,等. 基于微卫星标记的花鲈亲子鉴定技术[J]. 广东海洋大学学报,2023,43(5):26-33.
- [20] 苏胜彦,张林兵,李海洋,等. 基于微卫星标记的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)原种和养殖群体遗传多样性和结构分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2020,46(6):687-698.
- [21] 张敏莹,方弟安,周彦锋,等. 基于 SSR 标记的钱塘江中下游三角鲂 4 个放流苗种群遗传多样性和遗传结构检测[J]. 中国农学通报,2024,40(13):157-164.
- [22] 崔学海,沙航,曹继增,等. 克氏原螯虾湖北 7 个养殖群体遗传多样性的 SSR 分析[J]. 淡水渔业,2024,54(6):79-86.
- [23] 刘志刚,高风英,佟延南,等. 尼罗罗非鱼生长性状相关微卫星标记的筛选与验证[J]. 大连海洋大学学报,2023,38(6):925-934.
- [24] 王亚军. 鲢微卫星标记开发及湖北养殖群体遗传多样性分析[D]. 荆州:长江大学,2023.
- [25] 陈波,李美华. 牛蛙养殖技术与注意事项[J]. 湖南农业,2024(4):23.
- [26] 朱传炳,王瑛. 牛蛙(*Rana catesbeiana*)染色体研究[J]. 激光生物学报,2006(3):305-307.
- [27] 王晓清,基志仁,江辉,等. 雌雄牛蛙器官组织 LDH 同工酶初步研究[J]. 水利渔业,2005,25(4):7-8,12.
- [28] 周静. 乳酸脱氢酶的分离纯化及其性质的研究[J]. 赤峰学院学报(自然科学版),2009,25(9):111-113.
- [29] 陈祺祺. 湖北、四川、广东地区牛蛙脑膜炎样传染病病原分析[D]. 武汉:华中农业大学,2024.
- [30] 胡玉婷,凌俊,江河,等. 苏皖地区中华绒螯蟹养殖群体微卫星遗传多样性的评估[J]. 渔业科学进展,2024,45(6):178-187.
- [31] 潘秋芝. 斑鳊微卫星标记开发及其遗传多样性评价[D]. 贵阳:贵州大学,2022.
- [32] 陈薇薇,幸宁. 雪胆属转录组的 EST-SSR 分子标记开发[J]. 安徽农业科学,2023,51(9):160-163.
- [33] 向天翼. 托木尔峰野生赤狐遗传多样性及肠道菌群结构[D]. 阿拉尔:塔里木大学,2023.
- [34] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. Molecular Ecology,2005,14(8):2611-2620.
- [35] 陈文淳,彭凯,黄敏伟,等. 基于 SSR 标记分析 15 个凡纳滨对虾家系遗传多样性和遗传结构[J]. 生物工程学报,2024,40(12):4628-4644.
- [36] 闫春梅,郑伟,高春山,等. 基于微卫星标记的图们江大麻哈鱼遗传多样性分析[J]. 水产学杂志,2021,34(5):1-7.
- [37] 黄新志. 龙头鱼微卫星标记开发及群体遗传多样性研究[D]. 舟山:浙江海洋大学,2022.
- [38] 张帝. 不同大口黑鲈群体生长性能、营养价值和遗传多样性研究[D]. 南京:南京农业大学,2022.
- [39] 吉钰,陈再忠,温彬,等. 野生型和人工选育全蓝型七彩神仙鱼群体的遗传多样性分析[J]. 广东农业科学,2024,51(4):65-78.

- [40] WEIR B S, CLARK C C. Estimating f -statistics for the analysis of population structure [J]. *International Journal of Organic Evolution*, 1984, 38(6):1358-1370.
- [41] 池炳杰,常玉梅,闫学春,等. 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.
- [42] 吴贵清,李瑞华,肖意豪,等. 基于微卫星标记9个缙蛭群体的遗传多样性分析[J]. *热带海洋学报*, 2025, 44(2):124-136.
- [43] 张 瑞,郎 侠,吴建平,等. 岷县黑裘皮羊微卫星遗传多样性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(8):2360-2370.
- [44] 周梦晨,徐东坡,方弟安,等. 6个不同群体鳊基于SSR的遗传多样性初步研究[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(26):147-152.
- [45] BALLOUX F, LUGON-MOULIN N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2):155-165.
- [46] 黄 皓,范嗣刚,王鹏飞,等. 基于微卫星标记对6个花鲈群体的遗传多样性分析[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(1):99-106.
- [47] 冯兴浪,李军华,刘小燕. 产值规模冲刺千亿! 关于牛蛙的繁育,掌握这几点事半功倍[J]. *当代水产*, 2023, 48(2):73-76.
- [48] 陈莉莉. 产值600亿~800亿! 如今牛蛙养殖遍地开花,从业者:先求生存,后谋发展! 2023行情如何[J]. *当代水产*, 2023, 48(1):39-41.

(责任编辑:徐 艳)