

基于线粒体 12S 基因全序列分析 我国绵羊痒螨(兔亚种)的遗传多样性

李燕方, 古江, 袁媛, 谢跃, 赖为民, 杨光友, 古小彬*

(四川农业大学动物医学院, 成都 611130)

摘要: 为了探讨我国绵羊痒螨(兔亚种)的遗传变异情况及群体遗传结构, 采用 PCR 测序技术测定我国 5 个地区(华北、华东、华中、西北、西南)绵羊痒螨(兔亚种)线粒体 12S 基因的全序列, 并进行遗传多样性分析。结果共获得 89 条序列, 长度均为 657 bp, 核苷酸变异位点 76 个, 单倍型 50 个(H1~H50), 单倍型多样性(Hd)与核苷酸多样性(π)分别为 0.931 05 和 0.005 59。进一步分析发现 5 个地理种群遗传分化程度较弱($F_{st}=0.042\ 322$), 基因交流非常频繁($Nm=5.657\ 372$)。中性检验结果均为负值(Tajima's $D=-0.928\ 31$, Fu's $F_s=-7.066\ 71$), 并且差异性不显著($P<0.05$)。构建的 NJ 树和单倍型网络图均显示绵羊痒螨(兔亚种)5 个地理种群的 50 个单倍型散在分布于不同的支系内, 未形成明显的地理分布格局。我国绵羊痒螨(兔亚种)具有较高的遗传多样性, 且有一定的遗传分化, 基因交流频繁, 但未形成以兔品种、温度带和地域来源划分的种群遗传结构。

关键词: 绵羊痒螨(兔亚种); 线粒体 12S 基因; 遗传多样性

中图分类号: S852.746

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)11-2468-09

Genetic Diversity of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* Determined by the Full-length of Mitochondrial 12S Gene in China

LI Yan-fang, GU Jiang, YUAN Yuan, XIE Yue,

LAI Wei-min, YANG Guang-you, GU Xiao-bin*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To explore the genetic diversity and genetic structure of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi*, the complete sequence of mitochondrial 12S gene of *P. ovis* var. *cuniculi* isolates from 5 geographical regions (Huabei, Huadong, Huazhong, Xibei, and Xinan) in China, were obtained by PCR sequencing techniques, and evaluated the genetic diversity of *P. ovis* population. Eighty-nine sequences of mitochondrial 12S were obtained. The multiple alignments of the full 12S gene from 89 isolates were 657 bp. These sequences contained 76 variable sites and were classified into 50 haplotypes (H1-H50). The values of haplotypes diversity (Hd) and nucleotide diversity (π) were 0.931 05 and 0.005 59 respectively. There were low level of genetic differentiation, but high level of gene flow ($F_{st}=0.042\ 322$, $Nm=5.657\ 372$) among the 5 geographical population. In *P. ovis* population, the average values of Tajima's D and Fu's F_s were negative (Tajima's $D=-0.928\ 31$, Fu's $F_s=-7.066\ 71$) and there was no significant difference ($P<0.05$). NJ phylogenetic tree and haplotype network were both revealed that 50 haplotypes from 5 different geographical regions dispersed across different clades without associating with the geographical loca-

收稿日期: 2018-03-23

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31402188); 国家级大学生创新训练计划项目(201610626017)

作者简介: 李燕方(1992-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 主要从事动物寄生虫病学研究, E-mail: liyanfang9793@163.com; 古江(1992-), 男, 重庆人, 硕士, 主要从事动物寄生虫病学研究, E-mail: gujiang1205@qq.com。二人并列第一作者

* 通信作者: 古小彬, 副教授, 硕导, 主要从事动物寄生虫与寄生虫病学研究, E-mail: guxiaobin198225@126.com

tions. The results revealed that there was a high level of genetic diversity, little population genetic differentiation and high gene flow in the *P. ovis* var. *cuniculi* population of China, but population structure has not formed according to rabbits breed, temperature zones and geography origin.

Key words: *Psoroptes ovis* var. *cuniculi*; mitochondrial 12S gene; genetic diversity

中国是养兔大国,每年的兔肉、兔毛和兔皮产量均居世界前茅^[1-2]。痒螨病是危害养兔业的一种常见外寄生虫病,我国兔的感染率可达 70%左右,该病是由绵羊痒螨(兔亚种)(*Psoroptes ovis* var. *cuniculi*)寄生于兔的外耳道所引起的一种以耳道内形成卷纸样结痂、瘙痒、病变部皮肤增厚为临床特征,如不及时治疗,甚至可引起死亡,每年给养兔业造成巨大的经济损失^[3-5]。

微进化(又名内进化, microevolution)指种内或近源物种间的进化,是生物多样性源头和适应环境的基础。寄生虫的微进化可受其本身的生物学特性、宿主的种类和分布、所生活环境变化等因素的影响,且寄生虫的微进化对寄生虫种群的遗传多样性有重要意义^[6-7]。通过研究遗传多样性可分析物种的进化潜力及应对复杂环境的能力及历史发展动

态,推测未来发展趋势^[8]。我国家兔饲养区域广泛,饲养家兔品种较多,且各饲养区处于不同的地理环境和温度带,这些因素对兔体表寄生的痒螨的影响尚不明确。因此,笔者采集我国 5 个区域的獭兔和肉兔源的痒螨虫株,选用线粒体 12S 基因为目的片段,分析不同区域来源和不同兔品种来源的痒螨线粒体 12S 基因的差异,从而探讨我国绵羊痒螨(兔亚种)的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 绵羊痒螨(兔亚种)样品的来源

1.1.1 样品采集地点 从我国华北地区(河北)、华东地区(山东)、华中地区(湖北、河南)、西北地区(陕西)和西南地区(四川、云南)自然感染绵羊痒螨病的獭兔和肉兔耳部采集获得 89 个痒螨虫株(表 1)。

表 1 我国绵羊痒螨(兔亚种)不同种群样品采集情况表

Table 1 Sampling sites of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* populations in China

| 种群组 Population group | 省份 Province | 采样点 Sampling site | 样本数/编号 Sample size/No. | 兔种类 Species | 温度带 Temperature zone |
|-------------------------|----------------|----------------------|---------------------------|----------------|-------------------------|
| 华东地区 Huadong | 山东 | 济南 | 10/HD1~HD10 | 肉兔 | 暖温带 |
| 华中地区 Huazhong | 湖北 | 荆州 | 3/HZ1~HZ3 | 獭兔 | 亚热带 |
| | 河南 | 开封 | 4/HZ4~HN7 | 獭兔 | 暖温带 |
| 华北地区 Huabei | 河北 | 保定 | 6/HB1~HB6 | 獭兔 | 暖温带 |
| 西北地区 Xibei | 陕西 | 宝鸡 | 7/XB1~XB7 | 獭兔 | 暖温带 |
| 西南地区 Xinan | 四川 | 成都 | 10/XN1~XN10 | 肉兔 | 亚热带 |
| | | 西昌 | 16/XN11~XN26 | 獭兔 | 亚热带 |
| | | 绵阳 | 2/XN27~XN28 | 肉兔 | 亚热带 |
| | | 德阳 | 2/XN29~XN30 | 獭兔 | 亚热带 |
| | 云南 | 眉山 | 4/XN31~XN34 | 肉兔 | 亚热带 |
| | | 资阳 | 8/XN35~XN42 | 肉兔 | 亚热带 |
| | | 雅安 | 3/XN43~XN45 | 肉兔 | 亚热带 |
| | | 都江堰 | 7/XN46~XN52 | 肉兔 | 亚热带 |
| | 昆明 | 7/XN53~XN59 | 獭兔 | 亚热带 | |

1.1.2 痒螨的收集 将病兔耳部的痂皮用镊子轻轻取出,放入洁净的培养皿中,置于 37 °C 培养箱中,30 min 后除去皮屑,收集虫体,进行形态学鉴定^[9]确认后-20 °C 保存。

1.2 引物的设计

根据 GenBank 绵羊痒螨(兔亚种)的线粒体基因组(GenBank No.:KJ957822)找到线粒体 12S 基因全序列,利用 Primer Premier 5.0 设计用于扩增 12S 全序列的特异性引物。引物序列如下,12S-F: 5'-GCTTTGGGGGCTGTAGAATCAC-3'; 12S-R: 5'-CAAAAACCCTAAACAAGAGGCACC-3'。引物由上海生工生物科技公司合成。

1.3 单个虫体 DNA 的提取

将保存于-20 °C 的绵羊痒螨取出,每个样品挑出一只虫体放入一个 EP 管中,用尖头玻璃棒迅速研碎。然后采用 OMEGA 公司的 Mollusc/Arthropod 基因组 DNA 抽提试剂盒提取单个痒螨虫体的基因组 DNA,保存于-20 °C 冰箱中待用。

1.4 PCR 扩增及测序

25 μ L 的扩增体系包括 PCR Mixture 12.5 μ L,上下游引物各 1.0 μ L,模板 DNA 4.0 μ L,双蒸水 6.5 μ L。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,72 °C 延伸 10 min。扩增结束将 PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检查结果。将凝胶中条带大小与预期相符的胶块切割下来,移入 1.5 mL 灭菌离心管中,利用天根普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收。将胶回收产物连接入 pMD19-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选出阳性克隆,送上海生工生物科技公司进行正反向测序。

1.5 序列分析

1.5.1 遗传多样性分析 将测定的核酸序列运用 DNAMAN 5.2 对所测序列进行拼接、比对^[10],用 DNASTAR 5.1 对测序成功序列进行剪切修饰^[11]。通过 MEGA5.1 软件计算平均核苷酸差异指数(average number of nucleotide difference, K)、核酸分歧度(nucleotide divergence, D_{xy})、遗传距离^[12]。运用 Dna SP 5.1 软件计算单倍型多样性(haplotypes diversity, Hd)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)、单倍型数(number of haplotypes)^[13]。采用 Arlequin 3.1 通过分子方差分析(AMOVA)计算各个种群间的遗传差异指数(F_{st}),基因流(Nm)通过 $Nm=1/4(1/F_{st}-1)$ 计算获得^[14]。

1.5.2 遗传结构分析 中性检验(neutrality tests)结果(Tajima's D test, Fu's F_s test)由 Arlequin 3.1 软件计算得到^[14],结合 Dna SP 5.1 软件分析得到的错配分布曲线^[13],以了解我国绵羊痒螨(兔亚种)的历史动态。采用 MEGA 5.1 软件构建各种种群间的系统发育 NJ 树^[12],并 bootstraps 1 000 次,检验聚类树的置信度;同时结合 Network 5.0 制作单倍型网络图^[15]。

2 结果

2.1 痒螨 12S 基因全序列的碱基组成及变异

成功获得了 89 个绵羊痒螨兔亚种样品的 12S 序列(登录号:MH361034~MH361122),89 条 12S 基因全序列长度均为 657 bp,其中 A、T、C、G 平均含量为 31.34%、40.03%、10.20%、18.43%,平均 A+T 含量 71.37%,平均 C+G 含量 28.63%,出现明显的偏倚。89 条 12S 基因序列共存在变异位点 76 个,其中多变异位点 7 个,单变异位点 69 个。

序列的突变方式大部分是碱基转换(转换/颠换=6.9),其中包括 90 个转换($T \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow G$),13 个颠换($G \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow C$, $G \rightarrow C$),并且没有发现碱基的缺失。 $G \rightarrow C$ 颠换只存在于华中种群,华北种群和西北种群无颠换突变。所有种群中 $T \leftrightarrow C$ 转换率比 $A \leftrightarrow G$ 转换率高。

2.2 5 个地理种群遗传多样性参数及中性检验值分析

用 Dna SP 5.1 软件分析发现获得的 89 条 12S 序列共检测出 50 个单倍基因型(H1~H50);其中,西南种群所含单倍型数最多(35 个),有 32 个特有单倍型(H19~H50);其次为华东种群,所含单倍型数为 8 个,存在 7 个特有单倍型(H2~H8);华中和华北种群所含单倍型数相同,均为 6 个,分别存在特有单倍型 1 个(H12)和 4 个(H13~H16);以西北种群所含单倍型数最少(5 个),存在 2 个特有单倍型(H17、H18)(表 2)。50 个单倍型中存在 4 个共享单倍型(H1、H3、H9 和 H11);其中 H9 和 H11 被西南与华中、华北、西北种群所共有,共享频率最高,分别为 19.10%(17/89)和 14.61%(13/89);H1 被西南与华中、华东、西北种群共享,共享频率为 12.36%(11/89);单倍型 H3 仅被华中和华东种群所共享,共享率 2.25%(2/89)。

我国 5 大地区绵羊痒螨(兔亚种)种群的单倍型多样性(Hd)较高,范围为 0.857 14(西北种群)~

1.000 00(华北种群),我国整体种群单倍型多样性(Hd)为 0.931 05,表明我国种群单倍型多样性较为丰富。5 个地区种群中,华北种群的核苷酸多样性(π)最低(0.003 55),华东种群的核苷酸多样性(π)最高(0.005 82),中国整体核苷酸多样性(π)为 0.005 59(表 1),表明中国绵羊痒螨种群核苷酸多样性较高。我国 5 大地区种群的平均核苷酸差异指数(K)范围为 2.333 33(华北种群)~3.822 22(华东种群)。

利用 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验得到的中性检测结果见表 2。西南种群的 Tajima's D 和 Fu's F_s 均呈负值,且在我国 5 个种群中绝对值最高(Tajima's D = -2.406 94;Fu's F_s = -26.028 89)。华北种群与西南种群 Fu's F_s 为负值(-3.926 53 和 -26.028 89),且差异极显著,表明这两个种群近期可能经历过群体扩张;但我国绵羊痒螨整体种群的 Tajima's D (-0.928 31)和 Fu's F_s (-7.066 71)检验结果均为负值且不显著,表明我国绵羊痒螨群体符合中性进化假说,虽然西南种群与华北种群近期有过群体扩张,但并未对我国整体绵羊痒螨种群的扩张有明显的影响,从而我国整体种群呈现较为稳定状态。

2.3 遗传距离、核酸分歧度及分子变异分析

从表 3 可见,我国绵羊痒螨的遗传距离范围值为 0.003 97~0.006 54,其中华北地区与华东地区的遗传距离最大(0.006 54);华北地区与西北地区遗传距离最小(0.003 97)。我国绵羊痒螨的核酸分歧度(D_{xy})范围为 0.003 95~0.006 49,其中华北地区与华东地区、西北地区的核酸分歧度分别为 0.006 49 和 0.003 95。西南地区与其他 4 个地区相比,与西北地区之间的核酸分歧度(0.005 02)和遗传距离(0.005 06)均最小。

我国各种群间的基因流(Nm)为 0.724 32 至无限大(∞),遗传分化指数(F_{st})为 -0.094 25~0.256 59(表 4),5 个地区之间的基因交流情况有所不同。其中,西南与华中和西北种群之间的基因交流最为频繁,从而降低了西南与华中、西北种群间的核酸分歧度。我国整体绵羊痒螨种群的 Nm 和 F_{st} 分别为 5.657 372 和 0.042 322,表明我国绵羊痒螨整体基因流水平较高,遗传分化程度弱。分子方差分析结果发现,种群内和种群间的遗传变异方差比率分别为 95.77% 和 4.23%,表明本研究中绵羊痒螨的遗传变异主要发生在种群内部。

表 2 绵羊痒螨(兔亚种)群体遗传多样性参数

Table 2 Genetic diversity indexes of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi*

| 种群编号 Population | 样品数量 Number of isolates | 单倍型数(H) Number of haplotypes | 单倍型多样性(Hd) Haplotype diversity | 核苷酸多样性(π) Nucleotide diversity | 平均核苷酸差异指数(K) Average number of nucleotide differences | Tajima's D | Fu's F_s |
|--------------------|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|--|--------------|---------------|
| 华东 (HD1~10) | 10 | 8 (H1~H8) | 0.933 33 | 0.005 82 | 3.822 22 | -0.765 54 | -2.767 17 |
| 华中 (HZ1~7) | 7 | 6 (H1、H3、 H9~H12) | 0.952 38 | 0.005 51 | 3.619 05 | -0.078 74 | -1.808 29 |
| 华北 (HB1~6) | 6 | 6 (H9、H11、 H13~H16) | 1.000 00 | 0.003 55 | 2.333 33 | -1.390 31** | -3.926 53*** |
| 西北 (XB1~7) | 7 | 5 (H1、H9、H11、 H17~H18) | 0.857 14 | 0.004 35 | 2.857 14 | 0.000 00 | -0.802 69 |
| 西南 (XN1~59) | 59 | 35 (H1、H9、H11、 H19~H50) | 0.924 61 | 0.005 68 | 3.732 90 | -2.406 94*** | -26.028 89*** |
| 中国整体 Total | 89 | 50(H1~H50) | 0.931 05 | 0.005 59 | 3.673 65 | -0.928 31 | -7.066 71 |

*. $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$; *** . $P < 0.001$

表 3 我国绵羊痒螨(兔亚种)各地理种群间的核酸分歧度(上三角)与遗传距离(下三角)

Table 3 Pairwise comparisons of the nucleotide divergence (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between geographical populations of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi*

| 种群 Population | 华东 HD | 华中 HZ | 华北 HB | 西北 XB | 西南 XN |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 华东 HD | | 0.005 83 | 0.006 49 | 0.005 57 | 0.005 98 |
| 华中 HZ | 0.005 87 | | 0.004 60 | 0.004 50 | 0.005 55 |
| 华北 HB | 0.006 54 | 0.004 63 | | 0.003 95 | 0.005 63 |
| 西北 XB | 0.005 61 | 0.004 53 | 0.003 97 | | 0.005 02 |
| 西南 XN | 0.006 02 | 0.005 59 | 0.005 67 | 0.005 06 | |

表 4 不同绵羊痒螨(兔亚种)种群间的基因流(Nm)(上三角)和遗传分化度(F_{st})(下三角)Table 4 Gene flow (Nm) (above diagonal) and population pairwise fixation index (F_{st}) values (below diagonal) among different *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* populations

| 种群 Population | 华东 HD | 华中 HZ | 华北 HB | 西北 XB | 西南 XN |
|---------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|----------|
| 华东 HD | | 9.054 27 | 0.724 32 | 2.908 07 | 6.106 34 |
| 华中 HZ | 0.026 87(0.290 91) | | 28.035 00 | ∞ | ∞ |
| 华北 HB | 0.256 59(0.045 45) | 0.010 09(0.490 91) | | ∞ | 1.662 21 |
| 西北 XB | 0.079 16(0.263 64) | -0.094 25(1.000 00) | 0.002 60(0.463 64) | | ∞ |
| 西南 XN | 0.039 33(0.245 45) | -0.009 98(0.554 55) | 0.133 54(0.763 64) | -0.014 10(0.763 64) | |

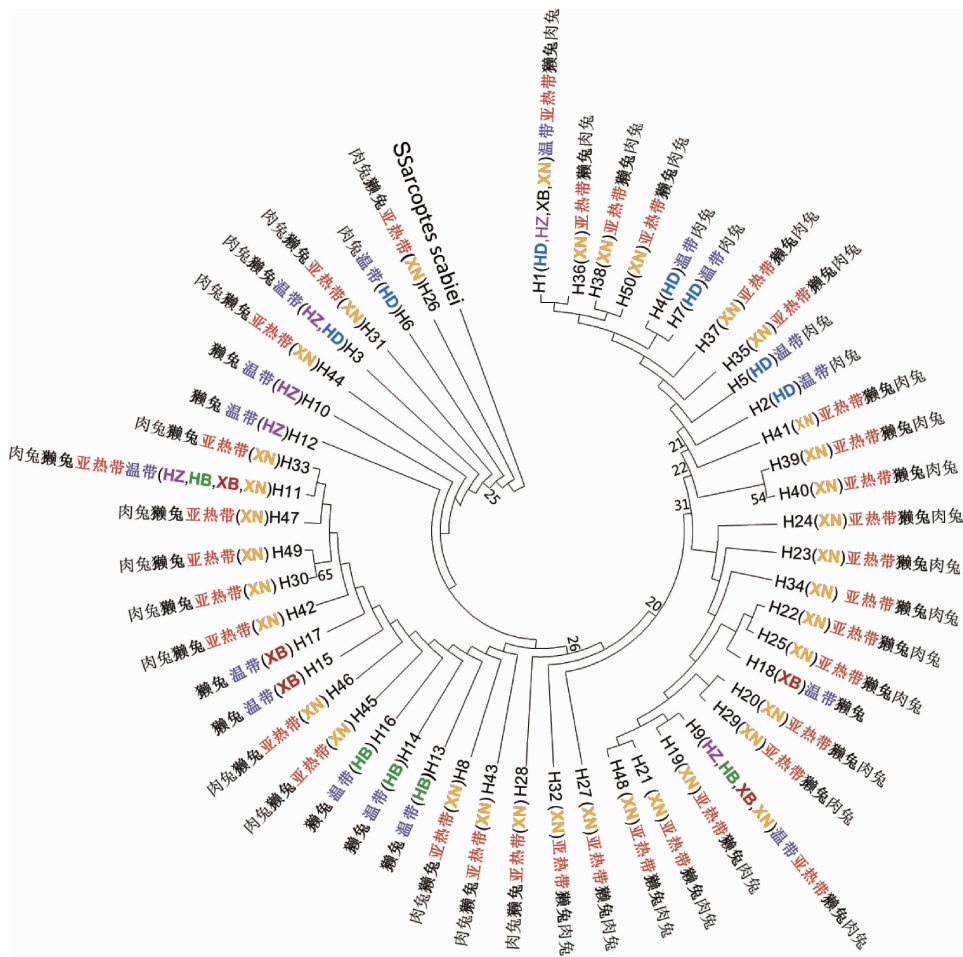
2.4 系统发育树的构建及种群整体遗传结构分析

以疥螨(*Sarcoptes scabiei*)的 12S 基因(GenBank No.: NC_031334)为外群,利用 MEGA 5.1 软件采用 NJ 法构建分子系统树,结果显示绵羊痒螨 5 个地理种群的 50 个单倍型散在分布于不同的支系内,如西南种群的 35 个单倍型散在于不同的分支(图 1),未按兔品种、温度带和地域来源的不同而聚类,而呈现为混杂的分布格局(图 1)。

为了确定单倍型的谱系关系,采用 Network 5.0 软件以 MJ(Median-Joining network)法构建 5 个不同地理种的 50 个单倍型(包括共享单倍型和特有单倍型)的网络图(图 2),单倍型网络图具有丰富的分支和节点,以优势单倍型(H1、H9、H11)为中心呈辐射状分布,缺失 3 个单倍型(图 2 中红色圆圈,分别用 mv1~mv3 表示),且各单倍型的聚类情况与 NJ 树类似,并未按兔品种、温度带和地域来源进行聚类。对我国绵羊痒螨世系进行群体历史动态分析,核苷酸不配对分布呈双峰型(图 3),表明早前未曾发生过群体扩张,长期处于一个较为稳定的状态。

3 讨论

寄生虫种群遗传多样性会受地理环境^[16]、寄生虫生物学特性、与宿主间的互相适应等多种因素影响^[17]。我国兔业养殖历史悠久,家兔养殖分布于除西藏外的各省、市、自治区^[1-2],这些不同地理区域包含了山地、高原、丘陵、盆地、平原等形态,地势地貌差异较大。这些差异较大地势地貌对绵羊痒螨兔亚种种群是否存在较大影响尚不明确。目前,绵羊痒螨种群的遗传多样性研究较为缺乏,仅笔者课题组的赵习彬等^[18]利用线粒体细胞色素氧化酶 b(*Cytb*)基因全序列进行了相关研究,12S 基因作为一种常见的分子标记,进化速度与 mtDNA 基因组的平均进化水平基本相同^[19],已广泛用于研究动物寄生性蜱螨种群遗传学^[20-21]。目前,GenBank 中除笔者课题组登陆的痒螨线粒体基因全序列中包含有 12S 序列信息外^[22],尚未见痒螨的其他 12S 序列,因此本研究基于我们测序得到的 89 条绵羊痒螨 12S 基因全序列探讨我国绵羊痒螨兔亚种种群的遗传变异,以期为进一步明确我国绵羊痒螨兔亚种的遗传多样性



H1~H50 表示 50 个单倍型;XN,HD,HZ,HB,XB 分别表示西南、华东、华中、华北、西北
H1-H50 represent 50 haplotypes; XN, HD, HZ, HB, XB, represent Xinan, Huadong, Huazhong, Huabei, Xibei

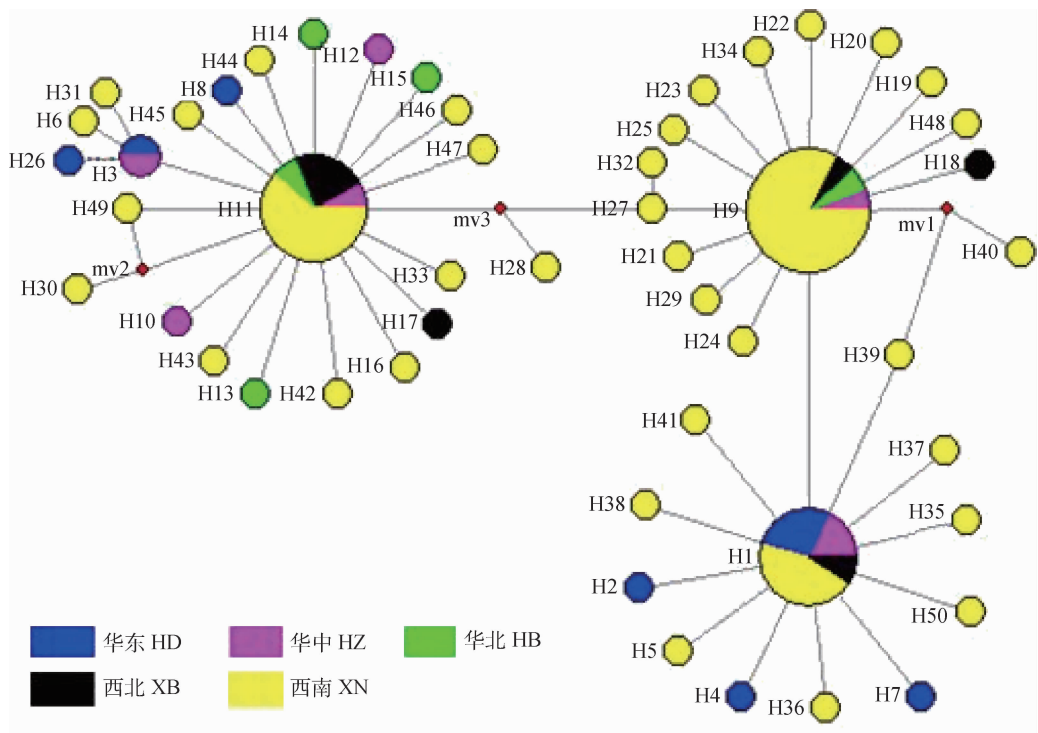
图 1 基于 50 个绵羊痒螨 12S 基因单倍型构建的 NJ 树
Fig. 1 Neighbour-joining tree constructed from the 50 haplotypes of mtDNA 12S gene in *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* based on Kimura-2-parameter distances

提供基础。

赵习彬等^[18]基于 *Cytb* 全基因发现我国绵羊痒螨(兔亚种)种群中存在着丰富的核苷酸多样性(0.012 0)和单倍型多样性(0.959 2),比笔者基于线粒体 12S 基因全序列得到的核苷酸多样性(0.005 59)和单倍型多样性(0.931 05)高,可能与 *Cytb* 基因(1 100 bp)全序列的长度大于 12S 基因全序列(657 bp),其所含有的信息位点更多有一定的关系;综合 *Cytb* 和 12S 基因的核苷酸多样性和单倍型多样性来看,两者值均较高,表明我国绵羊痒螨(兔亚种)种群有较高的遗传多样性水平。我国痒螨种群呈现的这种较高水平的核苷酸多样性和单倍型多样性,将更利于痒螨在进化过程中通过产生多种变异来应对不良环境因素^[23],有史可寻中国地区发生过一些如旱灾、雪灾等灾害,而这种遗传变异可能在痒螨抵御这些不利

环境因素中起到重要作用^[24]。赵习彬等^[18]和笔者本次研究的群体历史动态分析结果均呈现我国绵羊痒螨种群整体的中性检测 Tajima's *D* 和 Fu's *F_s* 检验结果均为负值,且差异均不显著,说明种群在历史演变中积累较多基因变异^[25]。结合错配分布曲线(图 3)中出现的两个峰值,表明绵羊痒螨种群在长期的历史进化过程中一直处于一个较为稳定的状态,种群早期可能并未经历过较大的群体扩张^[26],由此可见,即使个别种群(华北和西南)发生过群体扩张过程,使整体种群表现出较弱的突然增长,但并未影响到种群的整体稳定,这与赵习彬等^[18]的研究结果类似。

地理距离是影响种群间基因交流的重要因素之一^[27],但赵习彬等^[18]和笔者的研究发现绵羊痒螨(兔亚种)各地理种群间的基因交流与地理距离的远



圆圈的大小与单倍型的分布频率成正比;不同颜色代表不同样品来源
The circle sizes are proportional to the number of isolates; Different colors represent different sample sources

图 2 基于 50 个绵羊痒螨 12S 基因单倍型单倍型构建的单倍型网络图
Fig. 2 Network of mtDNA 50 12S gene haplotypes in *Psoroptes ovis* var. *cuniculi*

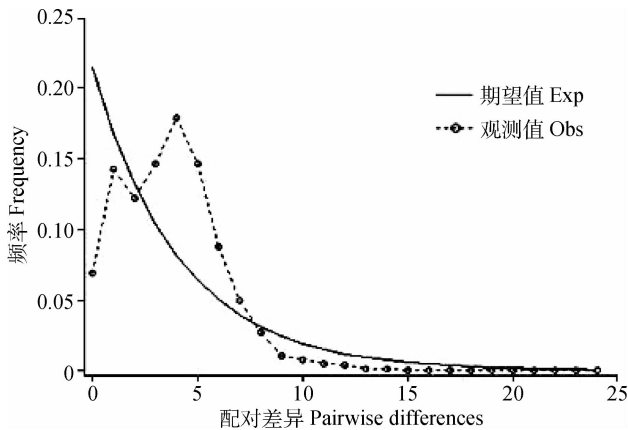


图 3 基于 12S gene 序列分析我国 89 株绵羊痒螨(兔亚种)虫株的错配分布曲线
Fig. 3 The mismatch-distribution of 89 *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* isolates based on 12S gene sequence

近并未全部表现出正相关的联系,基于绵羊痒螨 *Cytb* 基因发现,山东和河北的地理距离最近(340 km),但山东和河北两地的绵羊痒螨种群间的遗传距离不是最小的(0.001);本次研究基于 12S 基因发现保定(华北种群代表)与宝鸡(西北种群代表)间的地理距离比保定与济南(华东种群)的距离远,但华

北、西北种群内的基因交流值(趋于无穷大)却大于华北、华东种群(0.724 32)。由此可见,较远的地理隔离不能阻碍绵羊痒螨种群间频繁的基因交流,而这种基因交流单靠痒螨自身是不可能完成的,因为痒螨虫体较小,大小约(0.3~0.9) mm × (0.2~0.52) mm,其爬行能力较弱^[9],而不同地区间的兔贸易为各地痒螨种群间的基因交流提供了机会。然而,早期我国交通不便,较远地区间的兔贸易较少,导致各地痒螨种群间的基因交流较少;自 20 世纪 50 年代以来,中国家兔饲养量急剧增加^[1],交通便捷,各地间的兔贸易日益频繁,在一定程度上增加了各地的痒螨种群之间的基因交流。

F_{st} 是衡量种群遗传分化的指标,当 $0.00 \leq F_{st} < 0.05$ 时,遗传分化程度很弱;当 $0.05 \leq F_{st} < 0.15$ 时遗传分化程度中等; $0.15 \leq F_{st} \leq 0.25$ 时遗传分化程度较大^[28]。基于 12S 基因分析得到的 F_{st} 值($F_{st} = 0.042 322$)发现我国的绵羊痒螨种群存在一定的遗传分化,从而导致各地理种群间存在多个特有单倍型(46/50);但绵羊痒螨种群分化程度较弱($F_{st} < 0.05$),这与种群间频繁的基因交流相关($Nm = 5.657 372$);绵羊痒螨种群的这种遗传分化可能是

由地理环境差异、历史自然灾害、兔的品种等因素所造成的,但这种遗传分化可能由于时间不够尚未累积形成新的种群遗传结构,这点在 NJ 树和单倍型网络图分析中得到证实(图 1、图 2)。

单倍型网络图显示出优势单倍型有 3 个(H9、H11、H1)(图 2),有研究说明优势单倍型往往具有更加广泛的地理分布^[29-30],笔者的研究亦证实了这点,其中优势单倍型 H9、H11、H1 广泛分布在华东、华中、华北、西北、西南 5 个地区。另外单倍型网络图(图 2)中不能直接看出单倍型之间的进化关系,但出现历史单倍型的缺失(图 2 中红色圆圈,分别用 mv1~mv3 表示),这可能是由于某些地区样本数量太少,并且各单倍型的聚类情况与 NJ 树类似(图 1),总体上看,没有明显的地域性差别,也并未按兔品种、温度带进行划分,这点聚类特点在赵习彬等^[18]基于线粒体 *Cytb* 基因的研究中亦得到证实。

4 结 论

经对华东、华中、华北、西北、西南 5 个地区绵羊痒螨线粒体 12S 基因进行分析,发现我国绵羊痒螨(兔亚种)单倍型多样性高,核苷酸多样性低,基因交流频繁,未形成以兔品种、温度带和地域来源划分的种群遗传结构。

参考文献(References):

- [1] 洪霞芳. 中国兔产业发展研究[D]. 北京:北京林业大学, 2011.
HONG X F. Study on the development of rabbit industry in China[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011. (in Chinese)
- [2] 谢晓红,郭志强,秦应和. 我国肉兔产业现状及发展趋势[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(4):34-38.
XIE X H, GUO Z Q, QIN Y H. The situation and development trend on meat-rabbit industry in China[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2011, 47(4): 34-38. (in Chinese)
- [3] 赵恒章,王天有,刘保国. 肉兔耳痒螨病的诊治[J]. 中国养兔, 2005(3):4-5.
ZHAO H Z, WANG T Y, LIU B G. The diagnosis and treatment on *Otodectes mange* of meat-rabbit[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2005(3):4-5. (in Chinese)
- [4] RAFFERTY D E, GRAY J S. The feeding behaviour

of *Psoroptes* spp. mites on rabbits and sheep[J]. *J Parasitol*, 1987, 73(5):901-906.

- [5] NAVAJAS M, FENTON B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: A review[J]. *Exp Appl Acarol*, 2000, 24(10-11): 751-774.
- [6] LAGRUE C, JOANNES A, POULIN R, et al. Genetic structure and host-parasite co-divergence: Evidence for trait-specific local adaptation[J]. *Biol J Linn Soc*, 2016, 118(2):344-358.
- [7] SOLÓRZANO-GARCÍA B, GASCA-PINEDA J, POULIN R, et al. Lack of genetic structure in pinworm populations from New World primates in forest fragments[J]. *Int J Parasitol*, 2017, 47(14): 941-950.
- [8] 任旭琴. 遗传多样性及其研究方法[J]. 淮阴工学报, 2002, 11(5):6-8.
REN X Q. Genetic diversity and the methods[J]. *Journal of Huaiyin Institute of Technology*, 2002, 11(5):6-8. (in Chinese)
- [9] ZAHLER M, ESSIG A, GOTHE R, et al. Genetic evidence suggests that *Psoroptes* isolates of different phenotypes, hosts and geographic origins are conspecific[J]. *Int J Parasitol*, 1998, 28(11):1713-1719.
- [10] WOFFELMAN C. DNAMAN for windows, version 5. 2. 10[R]. Netherlands:Leiden University, 2004.
- [11] BURLAND T G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software[M]//MISENER S, KRAWETZ S A. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa, NJ:Humana Press, 2000:71-91.
- [12] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10):2731-2739.
- [13] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11):1451-1452.
- [14] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3. 5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3):564-567.
- [15] ANDRIANTSOANIRINA V, ARIEY F, IZRI A, et al. *Sarcoptes scabiei* mites in humans are distributed into three genetically distinct clades[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(12):1107-1114.
- [16] BARRETT L G, THRALL P H, BURDON J J, et

- al. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions [J]. *Trends Ecol Evol*, 2008, 23(12):678-685.
- [17] 黄丽琴,郭宪国. 寄生虫与宿主的协同进化关系[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2009, 36(1):49-54.
HUANG L Q, GUO X G. Coevolution between parasites and their hosts [J]. *International Journal of Medical Parasitic Diseases*, 2009, 36(1):49-54. (in Chinese)
- [18] 赵习彬,王保健,简克灵,等. 基于线粒体细胞色素氧化酶 b(cytb)全基因序列分析我国部分地区兔痒螨的遗传变异特征[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(4):714-721.
ZHAO X B, WANG B J, JIAN K L, et al. Analysis of the characteristics of genetic variability within *Psoroptes cuniculi* isolates in some regions of China, inferred by mitochondrial cytochrome oxidase b gene [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(4):714-721. (in Chinese)
- [19] 宋 洁,张小芳,刁雪淘,等. 线粒体 DNA12SrRNA、16SrRNA 研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(9):42-43, 37.
SONG J, ZHANG X F, DIAO X T, et al. Research progress of mitochondrial DNA, 12SrRNA, 16SrRNA [J]. *Auhui Agricultural Science Bulletin*, 2008, 14(9):42-43, 37. (in Chinese)
- [20] KRAKOWETZ C N, SPROAT A, LINDSAY L R, et al. Sequence variability in the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Val} genes of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) individuals shown previously to be genetically invariant [J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 29(3):177-181.
- [21] SKERRATT L, CAMPBELL N, MURRELL A, et al. The mitochondrial 12S gene is a suitable marker of populations of *Sarcoptes scabiei* from wombats, dogs and humans in Australia [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(4):376-379.
- [22] GU X B, LIU G H, SONG H Q, et al. The complete mitochondrial genome of the scab mite *Psoroptes cuniculi* (Arthropoda: Arachnida) provides insights into Acari phylogeny [J]. *Parasit Vectors*, 2014, 7:340.
- [23] 郝荣超,刘 芳,王国华,等. 不同兔种遗传多样性与聚类分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(4):706-711.
HAO R C, LIU F, WANG G H, et al. Genetic polymorphism and cluster analysis in different breeds of *Lepus* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(4):706-711.
- [24] 季维智,宿 兵. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1999.
JI W Z, SU B. Principles and methodologies of genetic diversity studies [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1999. (in Chinese)
- [25] ROUSSET F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance [J]. *Genetics*, 1997, 145(4):1219-1228.
- [26] 谢 跃,周 璇,孙 韵,等. 基于线粒体 12S 对中国两大山系大熊猫西氏贝蛔虫种群遗传多样性的分析 [J]. 兽类学报, 2015, 35(3):328-335.
XIE Y, ZHOU X, SUN Y, et al. Mitochondrial 12S-based analysis of genetic diversity of *Baylisascaris schroederi* in giant pandas from two mountain ranges in China [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2015, 35(3):328-335. (in Chinese)
- [27] AVISE J C. The history and purview of phylogeography: A personal reflection [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7(4):371-379.
- [28] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations; Volume 4 variability within and among natural population [M]. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press, 1978:4.
- [29] PALUMBI S R. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves [J]. *Ecol Appl*, 2003, 13(1):S146-S158.
- [30] KOCHZIUS M, BLOHM D. Genetic population structure of the lionfish *Pterois miles* (Scorpaenidae, Pteroinae) in the Gulf of Aqaba and northern Red Sea [J]. *Gene*, 2005, 347(2):295-301.

(编辑 白永平)