

DOI: 10.12264/JFSC2022-0135

长江干流水系鲢遗传多样性现状及成因分析

夏聪^{1,3}, 张雨阳^{1,3}, 戴逢斌², 唐文乔^{1,3}, 刘东^{1,3}

1. 上海海洋大学海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306;

2. 中国环境科学研究院, 北京 100012;

3. 上海海洋大学环境 DNA 技术与水生态健康评估工程中心, 上海 201306

摘要: 为探讨长江干流鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)种群的遗传多样性、分子变异和种群分化程度, 本研究在长江干流大尺度野外调查基础上, 利用线粒体细胞色素 b 基因序列特征, 比较分析了 13 个调查断面鲢野生种群的遗传多样性、遗传关系和历史动态。结果显示, 193 尾样本检测到 26 种单倍型, 132 个多态信息位点。种群的单倍型多样性(h)为 0.589~0.887, 核苷酸多样性(π)为 0.001~0.028; 上游群体平均 h 为 0.81, 平均 π 为 0.014; 中游群体平均 h 为 0.72, 平均 π 为 0.012; 两群体之间的 h 和 π 值无显著性差异($P>0.05$)。种群遗传分化指数(F_{st})为 -0.348~0.151, 种群间处于低至中度分化水平。长江干流中上游 2 群体的遗传分化小($F_{st}=0.001$), 分子方差分析表明遗传变异主要来自群体内(96.4%)。对 13 个鲢种群个体归类的 Structure 分析显示, 所有个体聚类为 3 个基因型类群, 每个基因型类群由不同种群个体组成, 基因型类型与调查断面分布格局无相关性。单倍型构建的系统发育树显示, 3 个分支没有形成与调查断面一致的地理格局。中性检验分析鲢种群历史, 单倍型网络图 3 个谱系中, 谱系 I 的 Tajima's D 值(-2.16)和 Fu's F_s 值(-13.73)呈现负值, 达到极显著水平($P<0.01$), 且核苷酸错配歧点分布为单峰曲线, 表明谱系 I 发生历史扩张, 其他 2 个谱系和 13 个鲢种群作为一个整体没有发生种群扩张。相对于长江中上游干流截然不同的生境, 鲢群体之间表现出较低的遗传差异。本研究可为长江干流鲢种质资源的保护和利用提供数据支撑。

关键词: 长江; 鲢; 遗传多样性; 细胞色素 b; 生物同质化

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)11-1612-13

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon Idella*)和青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)历来是我国重要的水产养殖种类, 称为“四大家鱼”。长江是中国四大家鱼最主要分布区和人工繁殖亲鱼的主要来源区, 为我国水产养殖的持续发展提供了优良的种质资源^[1]。鲢还有很高的生态价值, 其滤食浮游生物, 可控制水体中藻类泛滥, 具有净化水质的生态功能^[2]。但鲢自然繁殖需要特定的生境条件, 繁殖期内性腺经洪水刺激发育成熟, 产漂流性卵, 受精卵成功孵化要求一定的河流长度和水流速度, 随水漂流过程中孵化, 若水流速度

小, 受精卵会沉底而坏死^[3]。由于人类活动干扰了长江流域生境, 江河阻隔和涉水工程导致长江干流生境破碎化, 改变了河道天然形态和水文条件, 鲢生活环境被迫改变, 致使产卵场减少, 繁殖群体变小, 渔业资源严重衰竭。1997—1999 年长江宜昌至岳阳城陵矶江段渔业资源调查发现, 四大家鱼鱼苗径流量减少至三峡工程大江截流前同期的 32%^[4]。2014 年王红丽等^[5]对三峡库区丰都江段的鱼类早期资源调查发现, 四大家鱼仔鱼仅为总仔鱼数量的 0.18%。四大家鱼天然资源严重衰退, 引起公众高度重视, 长江中上游干流四大家鱼资源比较丰富的重庆段、监利段、黄石段先后

收稿日期: 2022-04-19; 修订日期: 2022-05-31.

基金项目: 生态环境部生物多样性调查与评估项目(2019HJ2096001006).

作者简介: 夏聪(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源. E-mail: 3149510964@qq.com

通信作者: 刘东, 男, 副教授, 研究方向为鱼类分类和渔业资源. E-mail: dliu@shou.edu.cn

被列为四大家鱼国家级水产种质资源保护区^[6]。鲢已被列入《国家重点保护经济水生动植物资源名录》。此外,为了恢复长江鲢资源、补充种群结构,自 2002 年始向长江流域投放了鲢鱼苗^[7],最近 4 年累计人工放流 30 亿尾^[8]。鲢是长江渔业资源不可或缺的重要组成部分,研究鲢种质资源的保护和利用,对于维持长江鲢遗传多样性具有重要的现实意义。

一直以来,长江干流鲢的遗传多样性缺乏大尺度和系统性的研究,仅在部分江段或局部进行调查和研究。李思发等^[1]采用线粒体 DNA (mtDNA) 限制性内切酶酶切片段长度多态分析技术,研究了长江中下游 3 个江段的鲢遗传多样性,表明鲢群体遗传差异显著。李小芳^[9]运用微卫星标记技术,发现长江中游石首和监利 2 个江段鲢群体间没有发生遗传分化。近年来,有学者采用 mtDNA 基因标记技术,开展了长江部分江段鲢种群的遗传学研究^[10-11]。由于 mtDNA 无组织特异性和相对稳定性,被广泛用于种群遗传研究^[12]。mtDNA

的细胞色素 b 基因(Cyt b)具有进化速度适中、转换/颠换比例大、分辨率高等优点,作为分子标记用于种群分化和系统发育研究^[13-14]。本研究采用 Cyt b 分子标记,分析长江干流水系 13 个江段的鲢野生种群的遗传结构,以期了解鲢种群的进化历史,评价人类活动对长江干流水系鲢种质资源的影响,为鲢种质资源的保护提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

长江干流自四川宜宾向家坝至江西湖口 2000 km 的江段,布点 18 个不同生境的调查采样断面,获批渔业(特许)捕捞证之后,于 2020 年 10 月—2021 年 8 月,在平水期、枯水期、丰水期利用渔船下网捕捞,最终在 13 个调查采样断面捕获鲢样本(图 1),物种鉴定依文献[15]。新鲜样本现场剪取背部去皮肌肉,保存于 95% 的乙醇溶液中,带回实验室-20 °C 冰箱保存备用。

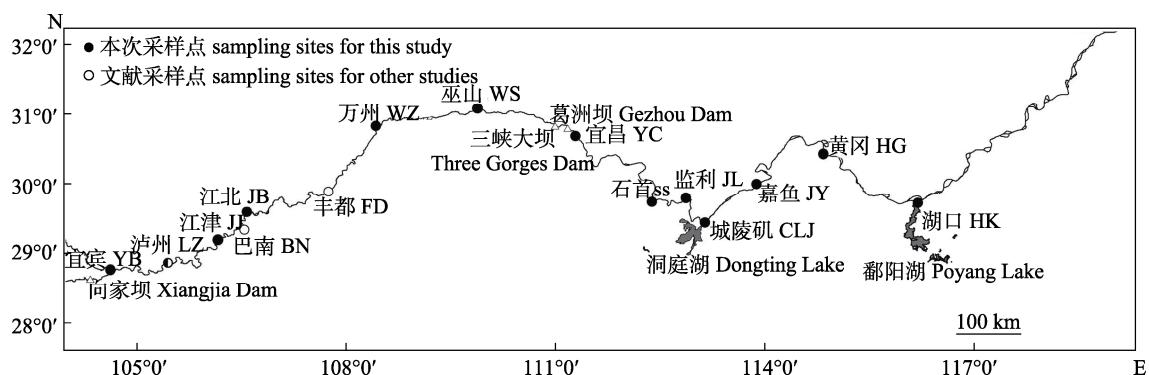


图 1 长江干流水系鲢调查采样点
Fig. 1 Sampling sites of silver carp in the Yangtze River

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增和测序

剪取 30 mg 肌肉放于 1.5 mL 离心管,剪碎,抽提 DNA 步骤参考 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒说明(上海生工)。提取的 DNA 质量采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,最后置于-20 °C 冰箱备用。

利用已知的鱼类 Cyt b 通用 PCR 引物^[16],结合鲢线粒体基因组序列(EU315941),设计鲢 Cyt b 基因全长 PCR 扩增引物 L14724 和 H15915,序列

分别为 5'-GACTTGAAGAACCAACCGTTG-3' 和 5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3'。PCR 反应体系 25 μL; 包括: ddH₂O 10.5 μL, Taq PCR Master Mix 12.5 μL (天根生物), 引物 L14724 和 H15915 各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL (100 ng)。PCR 反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,送上海生工生物工程技术服务有限公司使用 PCR 扩增引物双向测序。

1.3 数据分析

测序获得的序列使用 SeqMan 软件^[17]拼接、手工校对、计算 Cyt b 碱基组成。DnaSP 6.0 软件^[18]计算 Cyt b 遗传多态性，包括多态位点数(numbers of variable sites)、简约信息位点数(numbers of parsimony informative site)、单倍型数目(numbers of haplotypes)、单倍型多样性(haplotype, h)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)。结合 GenBank 数据库公布的长江上游鲢 Cyt b 基因 7 种单倍型(MT002859, -62, -64, -68~71)，利用 MEGA11 软件^[19]计算种群间的遗传距离，邻接法(NJ)、贝叶斯法(BI)和最大似然法(ML)模型构建单倍型系统发育树，NJ 树重复抽样 1000 次；MrBayes v 3.2 软件^[20]对 BI 树运行 8.9×10^5 代，构建模型一致树并计算后验概率；RaxML8.0 软件^[21]设置 1000 次自举检验，计算 ML 树分支置信度。Network 5.0 软件^[22]绘制单倍型网络关系图。

利用 Structure 2.3 软件^[23]进行基因型类群的种群遗传结构分析，采用 MCMC (Markov chain monie carfo) 模型时，开始不作数迭代参数设为 2.0×10^5 次，将每一个可能的遗传聚类群数目 K 拟定位 2~10，每个 K 值设定重复运行 3 次。使用 Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/>

structure Harvester)

Harvester) 计算 Delta K 峰值拐点处的适合 K 值，及其对应的 Q 值，依据 Q 值进行图形可视化。

运用 Arlequin35 软件^[24]的 AMOVA (analysis of molecular variance) 分析法，计算群体内和群体间的遗传分化指数值(F_{st})，随机重复抽样 1000 次进行显著性检验、核苷酸不配对分布(mismatch distribution)和中性检验(neutrality test)。模拟群体历史动态指标值包括 Tajima's D 值、Fu's F_s 值、偏差平方和(sum of squared deviation, SSD)、粗糙指数(Harpending's raggedness index, Hri)和扩张时间参数(τ)。利用公式 $t=\tau/2u$ ^[25]估算群体每个世代扩张时间，其中 u 为序列的变异速率， $u=2\mu k$ ，其中 μ 为序列的突变率，采用 1%/百万年^[26]， k 为序列的长度(bp)；鲢为不分批产卵类型，3 年性成熟^[27]，群体扩张时间 $T=3t$ 。

2 结果与分析

2.1 序列遗传多样性

长江干流水系 13 个调查采样点共获得鲢样本 193 尾(表 1)，Cyt b 基因全长 1140 bp，碱基 A、T、G、C 平均组成为 29.9%、28.3%、13.9% 和 27.9%。碱基分布不均，其中 G 含量明显最低，

表 1 长江干流水系鲢样本采集信息
Tab. 1 Information of silver carp's samples collected from the Yangtze River

种群 population	采集地点 collected site	采集时间 collected time	样本数量 sample number
宜宾 YB	28.778055°N, 104.617770°E	2020.11, 2021.4, 7	18
泸州 LZ	28.877887°N, 105.439640°E	2020.10, 2021.4, 8	8
江津 JJ	29.205752°N, 106.154377°E	2020.12, 2021.4	22
江北 JB	29.599242°N, 106.573659°E	2020.10, 2021.5	26
万州 WZ	30.830235°N, 108.428359°E	2020.11	3
巫山 WS	31.08064°N, 109.882746°E	2020.11, 2021.5, 8	15
宜昌 YC	30.689125°N, 111.285763°E	2021.6	2
黄冈 HG	30.438421°N, 114.841833°E	2021.7	3
嘉鱼 JY	30.002192°N, 113.879674°E	2020.12	2
石首 SS	29.742209°N, 112.385161°E	2020.12, 2021.6	43
监利 JL	29.802306°N, 112.872985°E	2021.6	11
城陵矶 CLJ	29.444522°N, 113.146082°E	2020.11, 2021.3, 8	33
湖口 HK	29.730833°N, 116.19944°E	2020.10, 2021.5, 7	7

表现为反 G 偏倚。T+A 含量(58.2%)高于 G+C (41.8%)。序列发生转换 13 次, 颠换 1 次, 转换数高于颠换数。

13 个鲢种群的 Cyt b 基因序列检测到 26 种单倍型(GenBank no: OM417143~OM417168), 多态信息位点包含 125 个简约信息位点和 7 个单突变位点。其中监利种群的简约信息位点数和多态位点数最多(表 2)。由于宜昌和嘉鱼野外调查捕获的样本量过少, 导致单倍型多样性 h 达到上限值 1, 显然不能体现种群的真实情况, 随后统计中排除。由此, 种群的单倍型多样性 h 范围为 0.589~0.887, 平均为 0.77, 江津种群 h 最高, 城陵矶 h 最低。种群的核苷酸多样性 π 范围为 0.001~0.028, 平均为 0.013, 监利种群的 π 最高, 泸州 π 最低。上游群体平均 h 为 0.81, 平均 π 为 0.014; 中游群体平均 h 为 0.72, 平均 π 为 0.012。中上游群体之间 h 值无显著差异($df=7.569, P>0.05$), π 值亦无显著差异($df=7.415, P>0.05$)。

2.2 种群遗传分化

鲢种群间的遗传距离, 上游宜宾与中游监利之间最大(0.026), 而上游泸州和中游嘉鱼之间最小(0.001); 种群内, 监利种群的遗传距离最大(0.03), 嘉鱼、黄冈、万州和泸州种群缺乏遗传分

化(表 3)。种群之间的遗传分化指数(F_{st})范围为 -0.348~0.151 (江北与城陵矶之间为 0.329, 由于江北调查采样点有鲢鳙杂交个体, 数据排除)。城陵矶与江津、宜宾、监利之间, 江津与监利、石首之间存在显著遗传分化($P<0.05$)。其余种群之间的 F_{st} 无显著遗传差异($P>0.05$)。AMOVA 分析表明, 以宜昌为界划分的长江中、上游干流水系鲢 2 群体的群体内变异百分数为 96.4%, 群体间的变异百分数为 3.6%; 中游和上游 2 个群体内的 F_{st} 为 0.036, 群体间的 F_{st} 为 0.001; 表明遗传变异主要来自群体内, 中上游干流水系鲢群体之间遗传分化非常小。

2.3 种群遗传结构

对长江干流水系 13 个鲢种群进行基于个体 Cyt b 序列归类的 Structure 分析, 从绘制的 Delta K 和不同 K 值的变化趋势线(图 2a)来看, Delta K 峰值时的 K 值为 3, 由此确定 13 个种群的个体最为适合归为 3 个基因型类群。从基因型聚类图的颜色占比来看, 个体来源于单一基因池(图 2b)。12 个种群均分布在不同的基因型类群中, 仅 JY (嘉鱼)种群分布在 1 个基因型类群中, 表明长江干流水系鲢种群的遗传结构趋同化。

表 2 长江干流水系鲢种群 Cyt b 遗传多样性指数

Tab. 2 Parameters of Cyt b diversity of silver carp's populations in the Yangtze River

采集地 sampling site	多态位点 variable site	简约信息位点 parsimony site	单倍型多样性 haplotype diversity, h	单倍型 haplotype	核苷酸多样性 nucleotide diversity, π
宜宾 YB	63	42	0.830	8	0.018
泸州 LZ	7	1	0.786	4	0.002
江津 JJ	63	45	0.887	8	0.018
江北 JB	47	45	0.815	6	0.012
万州 WZ	39	0	0.667	2	0.023
巫山 WS	63	35	0.876	9	0.012
宜昌 YC	10	0	1.000	2	0.008
黄冈 HG	6	0	0.667	2	0.004
嘉鱼 JY	1	0	1.000	2	0.001
石首 SS	52	46	0.842	12	0.009
监利 JL	95	90	0.800	6	0.028
城陵矶 CLJ	65	36	0.589	9	0.006
湖口 HK	43	3	0.714	4	0.011
合计 total	132	125		26	

表 3 长江干流水系鲢种群内(对角线上)和种群间(对角线以下)遗传距离以及种群间遗传分化指数 F_{st} (对角线以上)Tab. 3 Genetic distances within (on diagonal) and among (below diagonal) populations, and F_{st} among populations (above diagonal) of silver carp in the Yangtze River

种群 population	湖口 HK	监利 JL	江津 JJ	嘉鱼 JY	宜昌 YC	黄冈 HG	城陵矶 CLJ	石首 SS	万州 WZ	泸州 LZ	宜宾 YB	巫山 WS	江北 JB
湖口 HK	0.010	-0.008	-0.031	-0.298	-0.177	-0.185	-0.046	-0.059	-0.179	-0.016	-0.027	-0.085	-0.065
监利 JL	0.021	0.030	0.064*	-0.204	-0.217	-0.114	0.118*	0.104	-0.070	0.054	0.076	0.031	0.063
江津 JJ	0.015	0.025	0.020	-0.081	-0.141	-0.030	0.113*	0.062*	-0.173	0.111	-0.039	0.001	-0.011
嘉鱼 JY	0.006	0.017	0.012	0.000	-0.100	-0.286	-0.251	-0.197	-0.214	-0.359	-0.065	-0.237	-0.150
宜昌 YC	0.009	0.019	0.013	0.004	0.010	-0.286	-0.116	-0.150	-0.177	0.119	-0.060	-0.245	-0.206
黄冈 HG	0.007	0.018	0.013	0.002	0.004	0.000	-0.182	-0.157	-0.047	-0.143	0.009	-0.152	-0.103
城陵矶 CLJ	0.009	0.019	0.014	0.004	0.007	0.005	0.010	-0.001	0.137	-0.039	0.151*	-0.013	0.329
石首 SS	0.010	0.020	0.014	0.006	0.008	0.006	0.008	0.010	0.038	-0.006	0.099	-0.014	0.001
万州 WZ	0.014	0.025	0.017	0.012	0.015	0.013	0.014	0.014	0.000	0.045	-0.223	-0.076	-0.091
泸州 LZ	0.007	0.017	0.013	0.001	0.005	0.002	0.004	0.006	0.012	0.000	0.142	-0.004	0.041
宜宾 YB	0.015	0.026	0.018	0.013	0.016	0.014	0.015	0.015	0.017	0.014	0.020	0.028	0.019
巫山 WS	0.011	0.021	0.016	0.007	0.009	0.008	0.010	0.011	0.016	0.008	0.016	0.010	-0.348
江北 JB	0.011	0.022	0.015	0.008	0.010	0.008	0.010	0.011	0.015	0.008	0.016	0.012	0.010

注: * 表示种群间遗传分化指数 F_{st} 的差异显著($P<0.05$).

Note: * denoted population's F_{st} exhibiting significant difference ($P<0.05$).

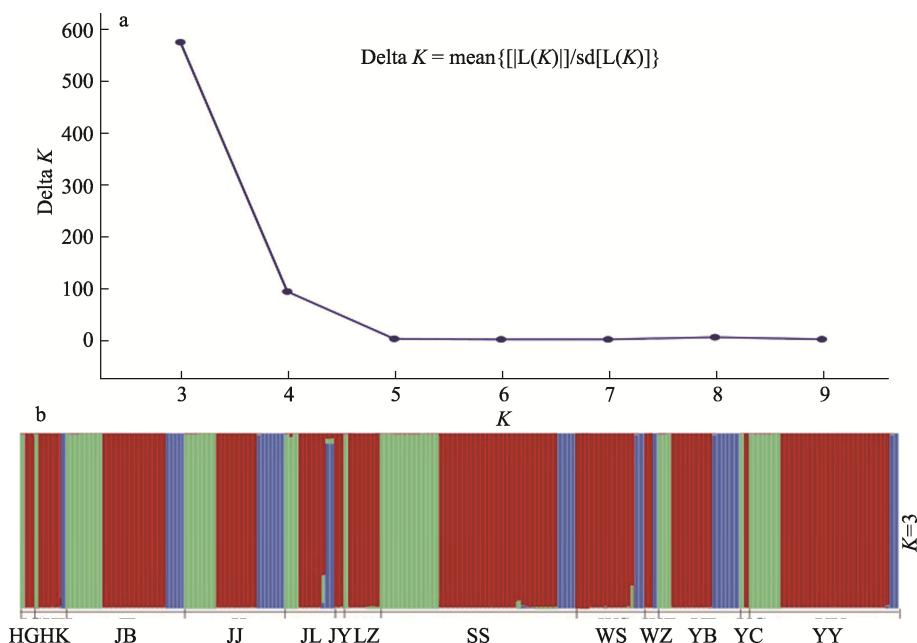


图 2 长江干流水系鲢 Structure 聚类图

a. Delta K 随 K 值变化趋势线; b. K 为 3 时 13 个鲢种群样本聚类图.

Fig. 2 Structure cluster diagram of silver carp in the Yangtze River

a. Curve of Delta K related with changing K value; b. Sample clustering of silver carp ($K=3$).

2.4 种群遗传关系

13 个鲢种群的 Cyt *b* 基因 26 种单倍型(表 4)中, 长江干流中上游种群共享单倍型 11 个, 而中上游种群特有单倍型各为 11 个。单倍型 Hap1 在

13 个种群出现, 频率达 39.9%。以 NCBI 数据库中青鱼和鳙的 Cyt *b* 基因序列(MT084757, EU343733)为外群, 结合数据库的 3 个种群(万州、丰都、巴南) Cyt *b* 基因的 7 种单倍型(Hap 27~33),

基于 NJ 法、BI 法和 ML 法构建单倍型系统发育树, 均具有相同的拓扑结构(图 3, 仅展示 NJ 树), 显示 33 种单倍型形成明显的 4 个支: Hap 12、Hap 13、Hap 25 聚为一支; Hap 2、Hap 3、Hap 6、Hap 14、Hap 16、Hap 20、Hap 27、Hap 28、Hap 30 聚为一支; 其他 20 种单倍型聚为一支; 各支单倍型的组成与鲢种群无关; Hap7 与鳙的 Cyt b 聚为一支, 说明 Hap 7 为鲢和鳙杂交产生的个体所具有的单倍型。由单倍型网络图(图 4)可知, Hap1 是祖先单倍型, 为 13 个种群共享; 其次 Hap 2、

Hap 3、Hap 13 被 8~11 个种群共享; Hap 7 表现为最长的突变步数, 是一种特化的单倍型。单倍型聚类结果与样本采集地理位置之间没有明显的相关性。基于 NJ 树和单倍型网络图均表明, 鲢 Cyt b 单倍型分为 3 个谱系(群体)。

2.5 长江中上游鮀群体的历史动态

应用中性检验 Tajima's D 和 Fu's F_s 等方法分析鲢种群历史，发现长江干流水系鲢作为一个群体的 Tajima's D 值呈现负值，Fu's F_s 值呈现正值，而 Cyt b 单倍型构建的群体 II 的 Tajima's D 值和 Fu's F_s

表 4 长江干流水系鮀种群 Cyt b 基因单倍型组成和分布

Tab. 4 Composition and distribution of Cyt b haplotypes in silver carp populations in the Yangtze River

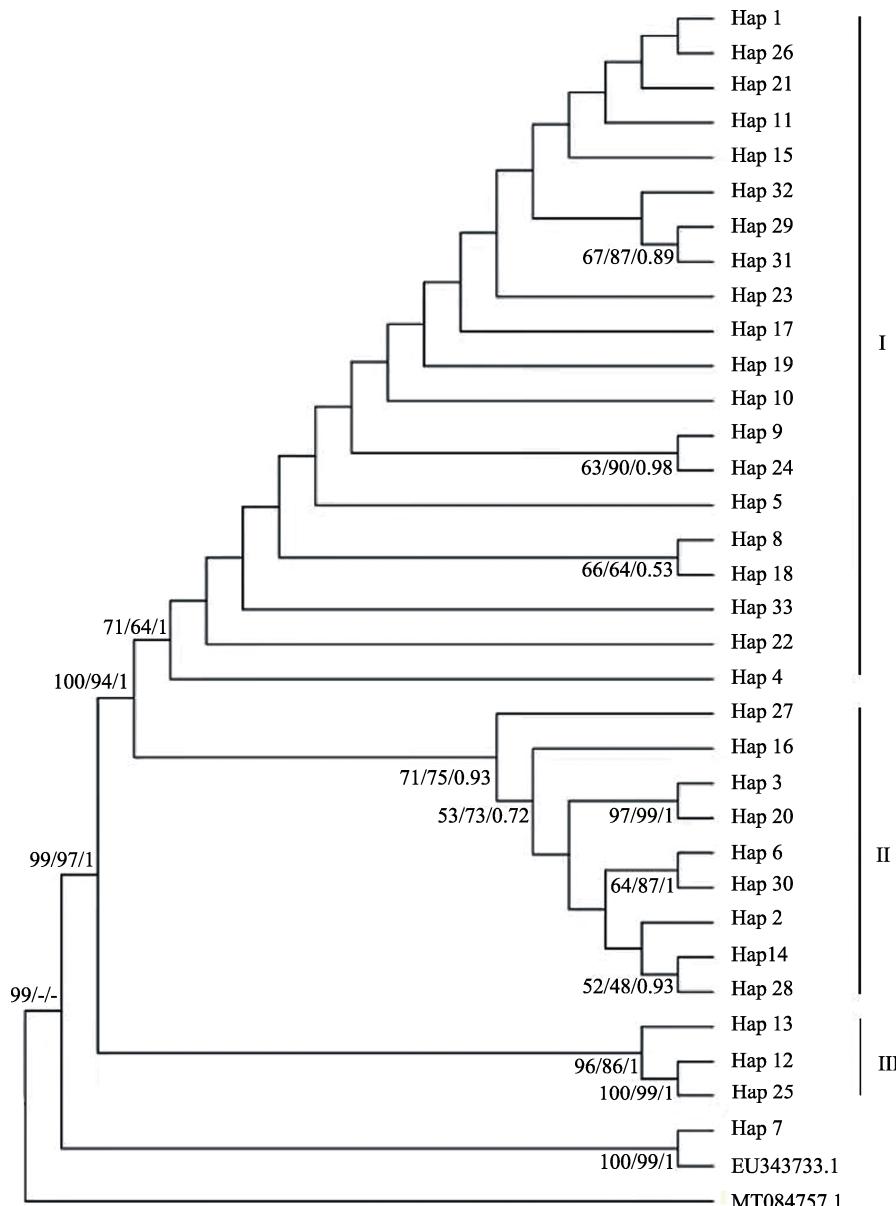


图 3 长江干流水系鲢 Cyt b 单倍型进化树
分支节点的数字分别为应用 NJ/ML/BI 构建的进化树的支持度.

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on Cyt b haplotypes of silver carp in the Yangtze River
Values at the nodes denote the support value of the phylogenetic trees constructed by NJ/ML/BI methods.

值呈现正值, 但统计检验均不显著($P>0.05$)(表 5), 表明符合中性进化的假设, 群体没有发生扩张。Cyt b 单倍型构建的群体 I 的 Tajima's D 值和 Fu's F_s 值呈负值, 且达到极显著水平($P<0.01$), 表明群体 I 偏离原来中性进化的假设, 群体发生过扩张事件。因为群体 III 包含的 Cyt b 单倍型数量少(3 个), 不进行群体动态分析。

核苷酸错配分析表明, 长江干流鲢作为一个

群体和 Cyt b 单倍型构建的群体 II, 单倍型分歧点分布为双峰曲线(图 5), 说明群体没有经历扩张。Cyt b 单倍型构建的群体 I, 其单倍型分歧点分布为单峰曲线(图 5), 并且观测值与期望值保持一致趋势, SSD 值(0.01)和 Hri 值(0.07)差异不显著($P>0.05$) (表 5), 表明未偏离原来假设, 符合群体扩张假说, 群体 I 曾发生过数量扩张和空间分布扩散, 时间为 5 Ma 前。

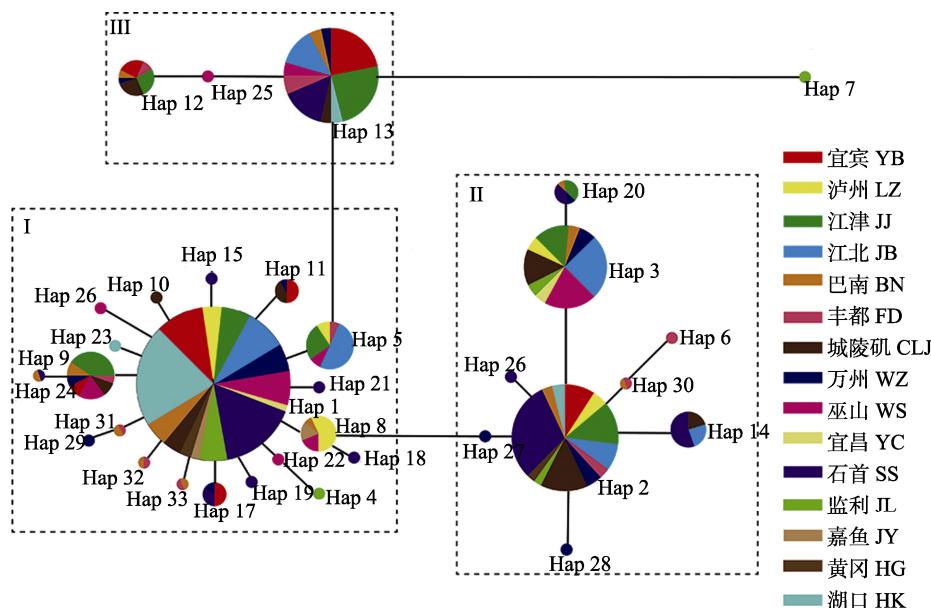


图 4 长江干流水系鲢 Cyt b 单倍型网络进化关系

颜色表示不同种群，色块大小表示单倍型出现频率，线段长度表示单倍型突变步数。

Fig. 4 Haplotype network based on Cyt b genes of silver carp in the Yangtze River
Colour denotes populations, block size denotes haplotype's frequency, and linear length denotes steps of haplotype mutation.

表 5 长江干流水系鲢群体 Cyt b 基因中性检验和核苷酸错配分布

Tab. 5 Neutrality tests and mismatch distribution of silver carp groups in the Yangtze River based on Cyt b gene

分组 group	中性检验 neutrality test		错配分布 mismatch distribution					
	Tajima's D	Fu's F_s	数量扩张模型 demographic expansion model			空间扩张模型 spatial expansion model		
			SSD	Hri	τ	SSD	Hri	τ
全部群体 all populations	-1.18	5.69	0.13	0.25	40.03	0.03	0.06	6.65
群体 I group I	-2.16**	-13.73**	0.01	0.07	0.81	0.01	0.07	0.80
群体 II group II	0.42	2.05	0.07	0.20	5.30	0.04	0.20	3.93

注: **表示中性检验和核苷酸错配分布数值的差异极显著($P<0.01$)。

Note: ** denoted neutrality tests and mismatch distribution exhibiting extremely significant difference ($P<0.01$).

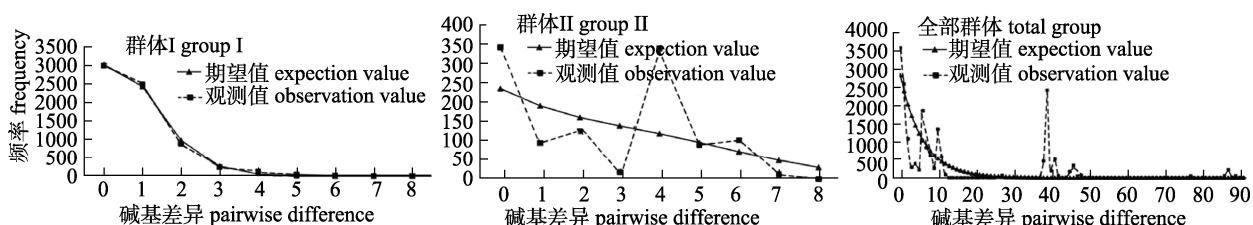


图 5 长江干流水系鲢群体数量扩张核苷酸错配分布

Fig. 5 Nucleotide-mismatched distributions of demographic expansion of silver carp in the Yangtze River

3 讨论

遗传多样性是生物多样性的基础，也是生物资源现状评估的重要参数。衡量生物遗传多样性的高低，线粒体基因单倍型多样性(h)和核苷酸

多样性(π)是 2 个重要指标，指标值越高，代表生物遗传多样性越高。本研究中，长江干流水系 13 个调查采样点 193 尾鲢样本 Cyt b 序列的 h 和 π 分别为 0.77 和 0.013，明显高于这 2 个指标在脊椎动物中的平均值(h 为 0.5, π 为 0.005)^[28-29]，略低于

翟东东等^[11]获得的长江上游鲢种群指标值($h=0.849$ 和 $\pi=0.014$)，高于陈会娟等^[10]对长江中游和上游鲢 4 群体研究的指标值($h=0.693$ 和 $\pi=0.007$)，表明长江干流鲢种群遗传多样性比较稳定并保持较高水平。通过比较发现，上游鲢种群的单倍型多样性较高($h=0.81$)，中游种群的单倍型多样性稍低($h=0.72$)，与李思发等^[1]对长江中下游鲢群体的研究结果基本一致。值得注意的是城陵矶种群的 h 最低，仅为 0.589。城陵矶江段为洞庭湖入长江通道，是江湖洄游性鱼类和半洄游性鱼类优良的栖息地与繁殖场。鲢是江湖洄游性鱼类，产出的漂浮性卵需要在河水涨落过程中孵化^[30]。由于洞庭湖的水利工程阻隔了江湖联通，以及长江中游江段的葛洲坝、胭脂坝、三峡工程等大坝极大地改变了长江水文条件，中下游江段的涨水时洪峰低平，涨幅较小，鲢的产卵活动受到抑制，城陵矶鲢的资源量锐减，种群偏小^[4]，降低了遗传多样性。另外，为了恢复长江鲢资源，长江中下游地区持续多年开展鲢人工增殖放流活动，洞庭湖人工放流活动最为频繁^[8]。陈文静等^[31]研究发现，增殖放流降低了鄱阳湖鲢种群的遗传多样性。城陵矶种群较低的遗传多样性是否与洞庭湖人工增殖放流有关值得深入研究。

F_{st} 值作为衡量种群遗传分化的重要指标，指标值的大小体现了不同种群的亲疏关系。有研究指出，当 $F_{st}<0.05$ 时，种群为低度遗传分化， $0.05< F_{st}<0.15$ 时为中度遗传分化， $F_{st}>0.15$ 时为高度遗传分化^[32]。通过比较研究发现，遗传距离最大(0.026)、亲缘关系最远的上游宜宾与中游监利种群之间的遗传分化指数 F_{st} 值为 0.076，表明这 2 个种群之间的遗传分化仅在中度水平。而遗传距离较小(0.01)的上游江北与中游城陵矶种群之间遗传分化程度高， F_{st} 值为 0.329，表明长江干流鲢种群的遗传分化与种群的遗传距离没有相关性。有研究表明，鱼类种群遗传距离小于 0.05 时，不同种群间的遗传分化归属于同一群体的遗传分化^[33]。由此可见，长江干流不同江段鲢种群，尽管表现出一定程度的遗传分化，不同地理种群应当作为一个群体，提示鲢种群的遗传多样性与不同江段

多样性的生境之间缺乏关联性。朱晓东等^[34]指出，长江鲢种群间的遗传距离未随地理距离增加而增大。王长忠等^[35]对中游监利、上游万州鲢种群的比较研究结果，同样说明了 2 种群间的遗传分化处于中等程度。本研究对根据地理划分的中游和上游群体之间遗传分化研究发现， F_{st} 为 0.001，呈现低度遗传分化。沙航等^[36]认为长江中、上游鲢群体之间存在显著遗传分化($F_{st}=0.176\sim0.193$)。从野外调查的江段生境来看，上游干流涉及金沙江下游下段和三峡水库等，有横江、岷江、沱江和赤水河等支流汇入调查断面，河道蜿蜒曲折，潭沱相间，水流急湍。中游干流有汉江和清江等支流汇入调查断面，以及洞庭湖、鄱阳湖入长江的调查断面，沿岸湖泊星罗棋布，河道逐渐开阔，流速减缓。中下游干流河道生境相似，李思发等^[1]认为长江中、下游江段的鲢群体之间未有明显的遗传分化，体现了鲢的生活环境与群体遗传分化的关系。本研究通过大尺度的野外调查采样分析发现，长江中上游干流截然不同的生境中鲢群体之间遗传分化较低，表明中上游鲢群体的遗传同质化。生物遗传同质化的驱动因素为生境破碎化和生境同质化等^[37]。长江上游众多的水坝，导致河流原有生境破碎化，水流急湍的生境变为过河性水库^[38]，类似中游干流河道生境，致使长江中游和上游鲢种群遗传趋同化。从长江干流水系 13 个鲢种群个体的聚类来看，12 个种群的个体分散在不同的基因型类群中，而基因型类群与地理位置无关，表明长江干流鲢群体的遗传趋同化是相似生态条件的选择结果。翟东东等^[11]认为增殖放流可能是影响长江上游鲢群体遗传趋同化的重要因素，在海洋鱼类海鲈(*Sebastiscus marmoratus*)和黄鳍马面鲀(*Thamnaconus hypargyreus*)中亦发现遗传趋同化现象^[39-40]。

本研究的长江干流鲢 *Cyt b* 基因 26 种单倍型，结合文献公开的长江干流的巴南、丰都、万州 3 个江段鲢种群的 7 个单倍型^[11]，共同构建单倍型网络图发现，Hap 1 是各种群共享的主体单倍型，为原始单倍型。各种群的单倍型并没有按地理位置形成独立的分支。Hap7 较为特别，在 NJ 树中

与鳙 Cyt b 基因(EU343733)聚为 1 分支, 根据线粒体母性遗传特性, 表明 Hap7 来自由雄性鲢和雌性鳙杂交产生的个体, 该个体遗传了鳙的线粒体基因单倍型, 但表现了鲢的外部形态特征。Jian 等^[41]报道利用线粒体基因标记, 发现自然水域中存在鲢和鳙物种间杂交形成存活个体的现象。

鱼类群体遗传多样性的高低和群体历史动态有必然的联系。应用中性检验和核苷酸错配分析长江干流水系鲢种群动态, Cyt b 单倍型构建的群体 I 显著偏离中性进化假设, Tajima's D 值和 Fu's F_s 值呈现负值, 达到显著性水平; 核苷酸错配分布为光滑单峰曲线, SSD 和 Hri 检验未偏离种群扩张模型, 表明长江干流鲢种群历史上发生过扩张, 时间距今约 5 Ma 前。该时期为冰期与间冰期的交替变化期, 海平面的上涨和消退驱动了长江流域鱼类种群的扩张^[42-43]。核苷酸错配整体上呈现多峰分布, 说明长江干流鲢种群扩张之后整体上维持稳定。本研究的结论与翟东东等^[11]较为一致, 整体上鲢的遗传差异较小, 长江上游的鲢群体没有发生过扩张。长江中上游干流河道长约 2000 km, 不同江段的水文条件和生境特征对鲢种群遗传多样性的影响, 以及增殖放流对鲢群体遗传同质化贡献等方面的问题值得深入研究, 以期为今后的渔业管理工作提供理论支撑, 避免过度放流可能带来的种质资源污染风险。

参考文献:

- [1] Li S F, Lu G Q, Bernatchez L. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. Current Zoology, 1998, 44(1): 82-93. [李思发, 吕国庆, 贝纳切兹. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.]
- [2] Liu D, Li S F, Tang W Q. Invasion status worldwide of the four major culture fishes and their adaptive features[J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(4): 143-152. [刘东, 李思发, 唐文乔. 世界范围内“四大家鱼”入侵现状及其适应性[J]. 动物学杂志, 2012, 47(4): 143-152.]
- [3] Xu C S, Ai Z Q, Xiao M. A review of influencing factors on natural reproduction of four major Chinese carps in Yangtze River[J]. Journal of China Three Gorges University (Natural Sciences), 2017, 39(4): 27-30, 59. [许承双, 艾志强, 肖鸣. 影响长江四大家鱼自然繁殖的因素研究现状[J]. 三峡大
- [4] Qiu S L, Liu S P, Huang M G, et al. Monitoring of spawning sites of four major Chinese carps in the middle section of Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(6): 716-718. [邱顺林, 刘绍平, 黄木桂, 等. 长江中游江段四大家鱼资源调查[J]. 水生生物学报, 2002, 26(6): 716-718.]
- [5] Wang H L, Li M Z, Gao X, et al. The status of the early stage fish resources in the Fengdu section of the Three Gorges Reservoir[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(5): 954-964. [王红丽, 黎明政, 高欣, 等. 三峡库区丰都江段鱼类早期资源现状[J]. 水生生物学报, 2015, 39(5): 954-964.]
- [6] Xiong M H, Yang Z, Hu X K, et al. Studies on fish community structure in Jianli section of the middle reaches of the Yangtze River[J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2019, 28(9): 2109-2118. [熊美华, 杨志, 胡兴坤, 等. 长江中游监利江段鱼类群落结构研究[J]. 长江流域资源与环境, 2019, 28(9): 2109-2118.]
- [7] Gui J F. History and reality of the release of the original species of four giant fishes in the Yangtze River[J]. China Fisheries, 2003(1): 11-12. [桂建芳. 长江四大家鱼原种放流的历史与现实[J]. 中国水产, 2003(1): 11-12.]
- [8] Zhang Z P, Dong F, Du H, et al. Current status and suggestions on stock enhancement in the middle and lower Yangtze River area[J]. Freshwater Fisheries, 2021, 51(6): 19-28. [张照鹏, 董芳, 杜浩, 等. 长江中下游区增殖放流现状与对策研究[J]. 淡水渔业, 2021, 51(6): 19-28.]
- [9] Li X F. The genetic effect evalution of eeleased parent *Hypophthalmichthys molitrix*[D]. Chongqing: Southwest University, 2012. [李小芳. 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)亲本增殖放流遗传效果评估[D]. 重庆: 西南大学, 2012.]
- [10] Chen H J, Liu M D, Wang D Q, et al. Analysis of the genetic diversity for 4 *Hypophthalmichthys molitrix* populations from middle and Upper Yangtze River[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(1): 20-25, 68. [陈会娟, 刘明典, 汪登强, 等. 长江中上游 4 个鲢群体遗传多样性分析[J]. 淡水渔业, 2018, 48(1): 20-25, 68.]
- [11] Zhai D D, Cai J, Yu J X, et al. Genetic diversity and population differentiation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the upper reaches of the Yangtze River[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2021, 57(2): 274-282. [翟东东, 蔡金, 喻记新, 等. 长江上游鲢群体遗传多样性和遗传分化[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2021, 57(2): 274-282.]
- [12] Islam S U, Qasim M, Ali H, et al. Genetic diversity of the families Aeshnidae, Gomphidae and Libellulidae through COI gene from South China[J]. Acta Tropica, 2018, 185: 学学报(自然科学版), 2017, 39(4): 27-30, 59.]

273-279.

- [13] Liu B J, Zhang K, Zhu K H, et al. Population genetics of *Konosirus punctatus* in Chinese coastal waters inferred from two mtDNA genes (CO I and cyt b)[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 534.
- [14] Ouyang M, Zhang X Y, Zhang F T, et al. Comparative studies on the genetic diversity of grass carp wild and cultured populations in the upper and middle reaches of the Yangtze River based on the mitochondrial Cyt b gene sequences[J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(4): 65-74. [欧阳美, 张晓宇, 张富铁, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因序列的长江中上游草鱼野生和养殖群体遗传多样性比较研究[J]. 淡水渔业, 2021, 51(4): 65-74.]
- [15] Chen Y Y. Fauna Sinica · Osteichthyes · Cypriniformes.II[M]. Beijing: Science Press, 1998. [陈宜瑜. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(中)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.]
- [16] Okazaki T, Jeon S R, Watanabe M, et al. Genetic relationships of Japanese and Korean bagrid catfishes inferred from mitochondrial DNA analysis[J]. *Zoological Science*, 1999, 16(2): 363-373.
- [17] Swindell S R, Plasterer T N. SEQMAN. contig assembly[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1997, 70: 75-89.
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [19] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [20] Bandelt H J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(1): 37-48.
- [21] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(8): 754-755.
- [22] Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [23] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 479-491.
- [24] Smouse P E, Peakall R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure[J]. *Heredity*, 1999, 82(5): 561-573.
- [25] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, 9(3): 552-569.
- [26] Zhang X Y, Zhang F T, Yao F C, et al. Study on genetic diversity and population historical dynamics of *Procypris rabaudi* (tchang) endemic in the Upper Yangtze River[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 330-338. [张晓宇, 张富铁, 姚富城, 等. 岩原鲤遗传多样性和种群历史动态研究[J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 330-338.]
- [27] Li S F, Zhou B Y, Lu G Q, et al. A study on the criteria and inspection of brooders of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp originated from the Yangtze River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(2): 143-151. [李思发, 周碧云, 吕国庆, 等. 长江鲢、鳙、草鱼和青鱼原种亲鱼标准与检测的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(2): 143-151.]
- [28] Grant W, Bowen B. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [29] Houki S, Yamada M, Honda T, et al. Origin and possible role of males in hermaphroditic androgenetic Corbicula clams[J]. *Zoological Science*, 2011, 28(7): 526-531.
- [30] Xiong F, Liu H Y, Duan X B, et al. Age and growth of *Hypophthalmichthys molitrix* in Jiangjin of the upper reaches of the Yangtze River[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2013, 35(3): 28-35. [熊飞, 刘红艳, 段辛斌, 等. 长江上游江津江段鲢种群的年龄和生长特征[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(3): 28-35.]
- [31] Chen W J, Zhang Y P, Duan X B, et al. Genetic diversity analysis of hypophthal michthys molitrix between wild and stock enhancement based on mitochondrial control region sequences in the Poyang Lake water system[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(35): 89-95. [陈文静, 张燕萍, 段辛斌, 等. 基于线粒体控制区全序列的鄱阳湖水系鲢增殖放流群体与野生群体的遗传多样性分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(35): 89-95.]
- [32] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations: A Treatise in four volumes, Volume 4 Variability within and among natural populations[M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- [33] 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.
- [34] Zhu X D, Geng B, Li J, et al. Analysis of genetic diversity among silver carp populations in the middle and lower Yangtze River using thirty microsatellite markers[J]. *Hereditas*, 2007, 29(6): 705-713. [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.]
- [35] Wang C Z, Liang H W, Zou G W, et al. Genetic variation analysis of two silver carp populations in the middle and

- Upper Yangtze River by microsatellite[J]. *Hereditas*, 2008, 30(10): 1341-1348. [王长忠, 梁宏伟, 邹桂伟, 等. 长江中上游两个鮰群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1341-1348.]
- [36] Sha H, Luo X Z, Li Z, et al. Genetic diversity of six silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) geographical populations based on mitochondrial COI sequences[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(4): 783-792. [沙航, 罗相忠, 李忠, 等. 基于 COI 序列的长江中上游鮰 6 个地理群体遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 783-792.]
- [37] Wang G M, Yang J C, Jiang C D, et al. A literature review on biotic homogenization[J]. *Biodiversity Science*, 2009, 17(2): 117-126. [王光美, 杨景成, 姜闻道, 等. 生物同质化研究透视[J]. 生物多样性, 2009, 17(2): 117-126.]
- [38] Lin P C, Wang C L, Liu F, et al. Current status and conservation planning of fish biodiversity in the Upper Yangtze River Basin in the context of hydropower development[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(S1): 130-143. [林鹏程, 王春伶, 刘飞, 等. 水电开发背景下长江上游流域鱼类保护现状与规划[J]. 水生生物学报, 2019, 43(S1): 130-143.]
- [39] Xu S Y, Yanagimoto T, Song N, et al. Population genomics reveals possible genetic evidence for parallel evolution of *Sebastiscus marmoratus* in the northwestern Pacific Ocean[J]. *Open Biology*, 2019, 9(9): 190028.
- [40] Wang Z Y, Zhang Y, Zhao L L, et al. Shallow mitochondrial phylogeographical pattern and high levels of genetic connectivity of *Thamnaconus hypargyreus* in the South China Sea and the East China Sea[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 67: 110-118.
- [41] Jian J, Yang L, Gan X, et al. Whole genome sequencing of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) provide novel insights into their evolution and speciation[J]. *Mol Ecol Resour*, 2021, 21(3): 912-923.
- [42] Long A Y, Tian H W, Wang D Q, et al. Genetic diversity between *Jinshaia sinensis* and *J. abbreviata* in the upper reaches of Yangtze River based on mitochondrial DNA[J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(3): 34-41. [龙安雨, 田辉伍, 汪登强, 等. 长江上游中华金沙鳅和短身金沙鳅线粒体遗传多样性研究[J]. 淡水渔业, 2020, 50(3): 34-41.]
- [43] Luo Y T, Fang D A, Zhou Y F, et al. Genetic diversity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in lower reaches of Yangtze River based on microsatellite markers[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(6): 48-57. [罗宇婷, 方弟安, 周彦锋, 等. 基于微卫星标记对长江下游鮰遗传多样性现状的分析[J]. 南方水产科学, 2021, 17(6): 48-57.]

Genetic diversity status of silver carp and its contributing factors in the Yangtze River

XIA Cong^{1,3}, ZHANG Yuyang^{1,3}, DAI Fengbin², TANG Wenqiao^{1,3}, LIU Dong^{1,3}

1. Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China;

3. Engineering Research Center of Environmental DNA and Ecological Water Health Assessment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Fish species diversity is richest across the Yangtze River, but fishery catches are rapidly decreasing due to human activities and excessive fishing in the past decades. Therefore, a “10-year Fishing Ban” plan was launched from January 2021, which aims to recover the fish stocks and aquatic resources across the Yangtze River Basin. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) is an important fishery resource in the reaches of the Yangtze River. However, a large-scale investigation on the genetic diversity, population differentiation, and influence of human activities on silver carp of the Yangtze River is currently lacking. To protect and utilize the silver carp resources in the Yangtze River, using sequence characters of mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene, we attempted to analyze genetic diversity, compare genetic relationships, and re-construct historical dynamics of silver carp via 13 wild populations from the middle and upper reaches of the Yangtze River. A pair of primers was designed for PCR amplification and sequencing of the full-length sequences of silver carp’s Cyt b gene. SeqMan, DnaSP 6.0, and MEGA11 softwares were used for DNA sequencing, genetic diversity, and phylogenetic tree analysis. MrBayes 3.2 and RaxML 8.0 softwares were applied to calculate the support values on the tree’s nodes. Network 5.0 software was employed to construct a haplotype network. Structure 2.3 and Arlequin35 softwares were used for sample clustering analysis and population dynamic analysis. The results showed that 26 haplotypes and 132 polymorphic informative loci were detected from a total of 193 samples. The haplotype diversity (*h*) ranged from 0.589 to 0.887, and nucleotide diversity (π) ranged from 0.001 to 0.028; the average *h* values were 0.81 and 0.72, and the average π values were 0.014 and 0.012 for the upper and middle reach populations, respectively. The values between the two populations did not change significantly ($P>0.05$). Genetic differentiation coefficient (F_{st}) for population pairs ranged from -0.348 to 0.151, suggesting lower to middle levels of genetic differentiation among 13 populations. The genetic difference between upper and middle populations was very small ($F_{st}=0.001$), and analysis of molecular variance found that 96.4% of variations occurred within populations. Genetic structure analysis showed that clustering samples of 13 populations, all samples were merged into three pools of gene, and each population (12 of 13) had a different gene pool from other populations samples; and there was no direct correlation between gene pools and sample-collected site distribution. The phylogenetic tree based on Cyt b gene haplotypes showed three main clades wherein each clade was composed of haplotypes from different geographical populations, and the three clades did not have a relationship with the distribution of sample-collected sites. Evolutionary network analysis based on haplotypes showed three clusters (I-III), and neutrality tests and mismatch distribution analysis indicated that Tajima’s *D* values (-2.16) and Fu’s *F_s* values (-13.73) of cluster I were significantly negative ($P<0.05$), and the results of nucleotide mismatch distribution were consistent with the hypothesis of the single-peak curve, indicating that the demographic expansion of cluster I occurred. The two other clusters and one large population formed by the 13 populations did not have an observed demographic expansion. In comparison to the high habitat difference between the upper and middle reaches of the Yangtze River, silver carp showed low genetic differentiation between the upper and middle populations. Our results provide basic data for protecting and utilizing the germplasm resource of silver carp in the Yangtze River.

Key words: the Yangtze River; *Hypophthalmichthys molitrix*; genetic diversity; cytochrome b; biotic homogenization

Corresponding author: LIU Dong. E-mail: dliu@shou.edu.cn