

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18058

基于 COI 序列的长江中上游鲢 6 个地理群体遗传多样性分析

沙航¹, 罗相忠¹, 李忠¹, 邹桂伟¹, 梁宏伟^{1,2}

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 农业农村部水生动物基因组学重点实验室, 湖北 武汉 430223

摘要: 为了对长江中上游鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)种质资源现状进行监测和评价, 本研究利用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome c oxidase subunit I) 基因(COI)对长江中上游宜宾、忠县、万州、石首、监利、湘江 6 个鲢群体进行了遗传多样性分析。结果表明, 在 648 bp 的 COI 序列中共检测到 42 个变异位点, 其中单变异位点 14 个, 简约信息位点 28 个。6 个群体 123 个个体共定义了 26 个单倍型, 单倍型多样性为 0.0476~0.0945, 核苷酸多样性为 0.00196~0.00982。6 个鲢群体总体遗传多样性丰富, 万州群体单倍型多样性和核苷酸多样性均最高, 忠县群体单倍型多样性最低, 核苷酸多样性最低的为石首群体。遗传变异主要来自群体内个体间, 单倍型网络图和系统进化树显示各群体的单倍型没有形成明显的地理格局。此外, 上游宜宾群体和万州群体与中游的石首、监利和湘江群体具有明显的遗传分化, 中游的监利群体与石首群体和湘江群体也有一定的遗传分化, 上游群体和中游群体应该分属于长江水系两个不同的种群。

关键词: 鲢; COI; 遗传结构; 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0783-10

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是典型的滤食性鱼类, 以浮游植物为食, 无需额外投饵, 可以有效降低养殖成本, 增加养殖收益, 加之其生长速度快, 产量高, 在我国淡水养殖业中具有重要的地位, 多年以来一直位居淡水养殖产量第二位, 2016 年养殖产量达 450 万 t^[1]。鲢能有效利用水体中浮游生物, 改善水体环境, 抑制藻类的爆发, 从而达到净化水质的目的, 作为净水渔业的重要组成部分, 越来越受到重视^[2-3]。长江是我国鲢天然的种质资源库, 鲢种质资源最佳, 然而由于各种人类活动导致栖息环境的剧变, 长江水系鲢种群日趋衰退, 成鱼捕捞量和苗种产量大幅下降, 种质资源受到严重威胁^[4-6]。

对长江鲢种质资源进行长期动态跟踪监测, 从遗传多样性的角度出发深入了解长江鲢种质资

源现状, 对于长江鲢种质资源的保护、挖掘和利用具有重要意义。截至目前, 已有一些科研人员对长江鲢群体遗传多样性进行了研究。例如, 庞美霞等^[7]利用微卫星标记分析认为长江上游三峡库区 5 个鲢群体没有遗传分化, 可以视为一个类群。王长忠等^[8]通过微卫星分析了长江中上游万州和监利两个地理群体的遗传变异, 认为两个群体间存在明显的遗传分化。于悦等^[9]对长江、赣江和鄱阳湖鲢群体遗传结构进行分析认为 3 个群体间存在频繁的基因交流。朱晓东等^[10]利用微卫星分析了长江中下游石首至安庆江段野生鲢群体的遗传多样性, 结果表明 5 个群体间存在中等的遗传分化。以往的研究广泛探讨了中下游江段鲢群体的遗传结构, 但对于长江中游、上游鲢群体遗传变异的研究相对较少, 研究群体也十分有限,

收稿日期: 2018-02-08; 修订日期: 2018-05-17.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2014A11, 2016HY-JC03); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-01).

作者简介: 沙航(1991-), 男, 硕士, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种. E-mail: ikriss@163.com

通信作者: 梁宏伟, 副研究员, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种. E-mail: lianghw@yfi.ac.cn

因此,开展长江中上游鲢群体的遗传多样性分析,对于全面把握鲢种质资源现状十分必要。

选择合适高效的分子标记是研究群体遗传多样性的一个关键因素。线粒体 DNA 具有母系遗传、进化速度快和检测简便等优点,已经被广泛应用于鱼类的遗传多样性、遗传结构、物种鉴定和系统发育等方面的研究^[11]。线粒体 COI 基因含有良好的系统发育信息,进化速率适中,已经广泛用于淡水鱼如达氏鲃(*Culter dabryi*)^[12]、黄鲢(*Monopterus albus*)^[13]和海水鱼类如大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[14]、波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)^[15]等群体遗传结构的研究。本研究以长江中上游宜宾、忠县、万州、石首、监利和湘江等 6 个鲢群体为研究对象,利用线粒体 COI 基因序列对长江中上游群体的遗传多样性和遗传结构进行分析,以期对长江水系鲢种质资源评价、保护和合理利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

六个鲢地理群体中长江上游群体采集自长江宜宾、忠县和万州江段,中游群体采集自石首老河长江四大家鱼原种场、监利老江河长江四大家鱼原种场和湖南鱼类原种场,原种场采集的样本均为苗种直接来自相应江段,经培育的原代鲢,共 123 个个体。采集的鲢鳍条样品经无水乙醇固定后置于-20℃冰箱中保存,样品保存在中国水产科学研究院长江水产研究所长江流域渔业生物标本库,样本采集信息如表 1 所示。

1.2 COI 序列扩增及测序

取鳍条组织样品进行基因组 DNA 的提取,鳍

条组织经蛋白酶 K 消化后,用高盐法提取基因组 DNA^[16],经 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测后,置于-20℃冰箱保存。线粒体 COI 扩增采用鱼类条形码 COI 的通用引物(CO I-1F/CO I-1R),并加 M13 接头引物。引物序列为: MCOI-1F: TGTA AAA-CGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC; MCOI-1R: CAGGAAACAGCTATGAC-ACCTCAGGGTGTCCGAARAATCARAA。

引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。PCR 扩增反应总体积为 25 μL,包含 10×PCR Buffer 2.5 μL, 0.25 mmol/L dNTP 2 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶(TaKaRa) 0.2 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, 50 ng/μL 模板 DNA 1 μL, 加超纯水至总体积 25 μL。反应在 S1000 型 PCR 仪上进行,扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 50 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行测序。

1.3 数据分析

测序拼接完成后通过 Clustal W 对序列进行比对与校正^[17]。采用 DnaSP 5.1 软件计算序列的碱基含量、变异位点数、简约信息位点数,单倍型数、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数(K)等参数^[18]。利用 MEGA 7.0 软件计算群体内及群体间的遗传距离,并基于双参数替代模型(K-2-P)构建邻接(Neighbor-joining, NJ)分子系统进化树,经 1000 次重复抽样检测其置信度^[19]。用 Arlequin3.1 软件计算两两群体间的遗传分化指数(F_{st}),采用 AMOVA 分析来检验群体遗传结构,通过 1000 次重抽样来检验 F_{st} 值的显著性^[20]。通过 SAMOVA 2.0 程序计算群体最大分化指数,选择最佳遗传分组^[21]。利用 Network 5.0 软件构建基于 Median-Joining 的单倍型网络图。

2 结果与分析

2.1 COI 序列特征分析

测序获得的目的片段经比对和校正后,获得长度为 648 bp 的 COI 序列。在 648 个位点中,变异位点 42 个(图 1),占总位点数的 6.5%,其中单

表 1 鲢样本采集信息

Tab. 1 Sampling information of *Hypophthalmichthys molitrix*

群体 population	采样地点 sampling site	位置 location	数量 number
宜宾 YB	宜宾	104°64'E, 28°77'N	20
忠县 ZX	忠县	108°09'E, 30°33'N	7
万州 WZ	万州	108°44'E, 30°84'N	11
石首 SS	石首老河	112°44'E, 29°76'N	28
监利 JL	监利老江河	112°94'E, 29°67'N	30
湘江 XJ	长沙捞刀河	112°99'E, 28°27'N	27

	11111112222233334444444444555555555666	
	115771344579144781237013456889000123499124	样本数量 number
	022248736861828717984797651084056624234424	
Hap1	TGGGTTAACGAGAAAGTACCTATTACAGTCATATTGAAGTAC	54
Hap2	 T	3
Hap3	 G A C	12
Hap4	 G	2
Hap5	 G	1
Hap6	. . . A C . .	7
Hap7	A	1
Hap8	 G C	3
Hap9	 G . . A G . C C	7
Hap10	 T T G . . C	11
Hap11	 A	4
Hap12	. A G	1
Hap13	 A G . . . A	1
Hap14	 C . . A . .	1
Hap15	 A T . T . . . A T .	1
Hap16	. . A . . A	1
Hap17	 A A	1
Hap18	. . A	1
Hap19	 G	2
Hap20	 C C C T . . C . . T . . C . . G . C . . . C . .	2
Hap21	 G . . A G A C A . T . . C	2
Hap22	. . . A A	1
Hap23	 G A	1
Hap24	 G . . . G A . G C . C G T . C . C . . T C . .	1
Hap25	A G A C	1
Hap26	A . . . C C C T . . C . . T . . C C . .	1

图 1 鲢线粒体 COI 序列变异位点

上方数字表示变异位点在单倍型中对应的位置, 左侧 Hap1~Hap26 表示单倍型名称.

Fig. 1 Variable site of mitochondrial COI gene for *Hypophthalmichthys molitrix*

Numbers of the top represent the locations of mutative nucleotide in the 26 haplotypes of *H. molitrix*. Hap1–Hap26 on the left are the names of 26 haplotypes.

变异位点 14 个, 简约信息位点 28 个, 没有发现插入/缺失位点, 转换明显多于颠换, 转换颠换比为 10.7。COI 序列的 A、T、G 和 C 平均含量分别为 26.20%、29.73%、17.13%和 26.94%, A+T(55.93%)的含量高于 G+C(44.07%), 表现出碱基组成的偏倚性, 与鱼类线粒体蛋白质编码基因碱基组成特点一致。

2.2 鲢群体遗传多样性

基于 COI 的鲢遗传多样性统计结果如表 2 和表 3 所示。123 个个体共检测到 26 个单倍型, 湘江群体享有最多的单倍型数, 有 10 个单倍型, 万州群体次之(9 个), 忠县群体单倍型数最少, 仅有 2 个。宜宾群体变异位点数最多, 有 20 个变异位点, 占总变异位点的 47.62% (20/42), 由 8 个单倍

表 2 26 个单倍型在 6 个鲢群体中的分布
Tab. 2 Distribution of 26 haplotypes of 6 *Hypophthalmichthys molitrix* populations from the upper and the middle reach of the Yangtze River

单倍型 haplotype	宜宾 YB (20)	忠县 ZX (7)	万州 WZ (11)	石首 SS (28)	监利 JL (30)	湘江 XJ (27)	总计 total
Hap1	5	5	3	17	8	16	54
Hap2				2	1		3
Hap3	3	2	1	3	3		12
Hap4				2			2
Hap5				1			1
Hap6	3			1	3		7
Hap7				1			1
Hap8				1		2	3
Hap9					7		7
Hap10	3				8		11
Hap11	2					2	4
Hap12						1	1
Hap13						1	1
Hap14						1	1
Hap15						1	1
Hap16						1	1
Hap17						1	1
Hap18						1	1
Hap19	1		1				2
Hap20	1		1				2
Hap21	2						2
Hap22			1				1
Hap23			1				1
Hap24			1				1
Hap25			1				1
Hap26			1				1

型组成。其中 Hap1 广泛分布于 6 个群体, 包含了 54 个个体, 为优势单倍型; 单倍型 Hap3 为除湘江群体以外的 5 个群体共享, 由 12 个个体组成; 单

倍型 Hap4、Hap5、Hap7 为石首群体特有, Hap9 为监利群体独享, Hap12~Hap18 为湘江群体特有, Hap21 为宜宾群体独享, Hap22~Hap26 为万州群体特有。

6 个群体单倍型多样性为 0.476~0.945, 核苷酸多样性为 0.00196~0.00982, 平均核苷酸差异为 1.27~6.36。总体单倍型多样性为 0.785, 万州群体单倍型多样性最丰富, 单倍型多样性为 0.945, 单倍型多样性最低的是忠县群体($H_d=0.476$), 在 6 个群体中只有忠县群体单倍型多样性小于 0.5, 遗传多样性较低。总体核苷酸多样性为 0.00524, 核苷酸多样性最高的为万州群体(0.00982), 最低的为石首(0.00196), 其中万州、宜宾和监利群体较高($\pi>0.005$), 而石首、湘江和忠县群体较低($\pi<0.005$)。

2.3 鲢群体遗传结构

鲢群体内和群体间的遗传距离如表 4 所示, 6 个群体群体内遗传距离为 0.0028~0.0141, 群体内遗传距离最大为万州群体(0.0141), 两两群体间的遗传距离为 0.0030~0.0130, 群体间遗传距离最大的是万州和监利群体(0.0130)。从上游与中游两大组群分析, 上游三个群体的群体间遗传距离为 0.0061~0.0117, 遗传距离最大的为宜宾与万州群体。中游群体的群体间遗传距离为 0.0031~0.0067, 遗传距离最大的为监利与湘江群体。上游和中游群体的遗传距离跟地理位置没有明显的相关性。

通过 Arlequin 软件分析鲢群体间的遗传分化, 结果显示, 长江上游宜宾、忠县、万州三个群体之间 F_{st} 均小于 0.05, 且差异不显著, 表明三个群体之间的分化程度较低。长江中游石首、监利和

表 3 长江中上游 6 个鲢群体遗传多样性
Tab. 3 Genetic diversity for 6 *Hypophthalmichthys molitrix* populations from the upper and the middle reach of the Yangtze River

群体 population	变异位点 variable site	单倍型数 number of haplotypes	单倍型多样性 H_d	核苷酸型多样性 π	平均核苷酸变异数 K
宜宾 YB	20	8	0.889	0.00724	4.70
忠县 ZX	3	2	0.476	0.00220	1.43
万州 WZ	3	9	0.945	0.00982	6.36
石首 SS	9	8	0.627	0.00196	1.27
监利 JL	14	6	0.809	0.00650	4.21
湘江 XJ	15	10	0.652	0.00254	1.65
总体 total	41	26	0.785	0.00542	3.40

表 4 鲢线粒体 COI 群体间的分化系数(F_{st})(对角线上方)和群体内(对角线)及两两群体间的遗传距离(对角线下方)
Tab. 4 The fixation index (above diagonal) among populations, genetic distance within populations (diagonal) and among populations (below diagonal) of *Hypophthalmichthys molitrix*

群体 population	宜宾 YB	忠县 ZX	万州 WZ	石首 SS	监利 JL	湘江 XJ
宜宾 YB	0.0088	-0.0200	0.0288	0.0900**	0.0453*	0.1115**
忠县 ZX	0.0061	0.0033	0.0128	-0.0219	0.1133*	0.0198
万州 WZ	0.0117	0.0092	0.0141	0.1763**	0.1819**	0.1939**
石首 SS	0.0062	0.0030	0.0095	0.0028	0.1784**	0.0106
监利 JL	0.0089	0.0067	0.0130	0.0064	0.0082	0.1762**
湘江 XJ	0.0067	0.0034	0.0101	0.0031	0.0067	0.0033

注: “*”表示差异显著($P<0.05$), “**”表示差异极显著($P<0.01$).
Note: “*” means significant difference ($P<0.05$); “**” means extremely significant difference ($P<0.01$).

湘江三个群体中, 监利与石首, 监利与湘江之间的 F_{st} 分别为 0.1784 ($P<0.01$)和 0.17622 ($P<0.01$), 监利群体与石首和湘江群体遗传分化程度较高。此外, 万州群体与中游三个群体之间的 F_{st} 值均大于 0.15 (F_{st} : 0.1763~0.1939, $P<0.01$), 表明万州群体与中游三个群体存在较高的遗传分化。宜宾群体与中游的三个群体也存在明显的遗传分化。

对不同鲢群体间的变异进行分子方差分析(表 5), 群体内的遗传变异占总变异的 88.72%, 群体间的遗传变异仅占 11.28%, 遗传变异主要来自于群体内个体间。将 6 个群体分为长江上游组群和长江中游组群, 上游群体和中游群体的组间变异占总变异的百分比为 2.34%, 组内群体间遗传变异占 9.91%, 群体内遗传变异百分比为 87.75%, 两组群遗传变异也主要来自群体内个体间。

SAMOVA 分析显示, 将宜宾(YB)群体单独分为一组, 其他 5 个群体分为一组时, 组间遗传分化指数最大(F_{ct} =0.99148), 两个理论群体的遗传变异主要来自组间, 占总遗传变异的 99.15%。

为了更直观描述鲢各群体间的遗传结构, 绘制了单倍型之间的网络关系图(图 2), 26 个单倍型在 6 个群体中的分布结果显示, 各单倍型并没有按不同地理群体而形成独立的分支, 而是以主单倍型为中心的星形放射状结构。单倍型在群体中的分布情况如图 2 和图 3 所示, 共享单倍型占有所有单倍型的 35%(9/26), 其中 Hap1 由 6 个群体共享, 可能为鲢的原始单倍型, 单倍型 Hap3 被除湘江群体外的 5 个群体共享。

2.4 基于 COI 序列的系统进化

采用 K-2-P 模型计算群体间的遗传距离, 以

表 5 鲢线粒体 COI 序列群体内和群体间变异的 AMOVA 和 SAMOVA 分析
Tab. 5 The AMOVA and SAMOVA analysis among and within *Hypophthalmichthys molitrix* populations based on COI sequences

变异来源 source of variation	自由度 df	方差总和 sum of squares	变异组分 variance component	变异贡献率% percentage of variation	遗传分化指数 fixation index
AMOVA(未分组)					
群体间 among population	5	188.326	1.65463	11.28	F_{st} =0.11278**
群体内 within population	117	583.47	4.98693	88.72	
AMOVA(分为上游组和中游组)					
组间 among groups	1	7.082	0.0411	2.34	F_{ct} =0.02341
组内群体间 populations within groups	4	20.013	0.17397	9.91	F_{sc} =0.10147**
群体内 within populations	117	180.252	1.54061	87.75	F_{st} =0.12250**
SAMOVA (分 2 组: 1. YB; 2. ZX+WZ+SS+JL+XJ)					
组间 among groups	1	26047.170	776.17698	99.15	F_{ct} =0.99148
组内群体间 populations within groups	4	182.260	2.10467	0.27	F_{sc} =0.31556**
群体内 within populations	117	534.099	4.56495	0.58	F_{st} =0.99417**

注: “*”表示差异显著($P<0.05$), “**”表示差异极显著($P<0.01$).
Note: “*” means significant difference ($P<0.05$); “**” means extremely significant difference ($P<0.01$).

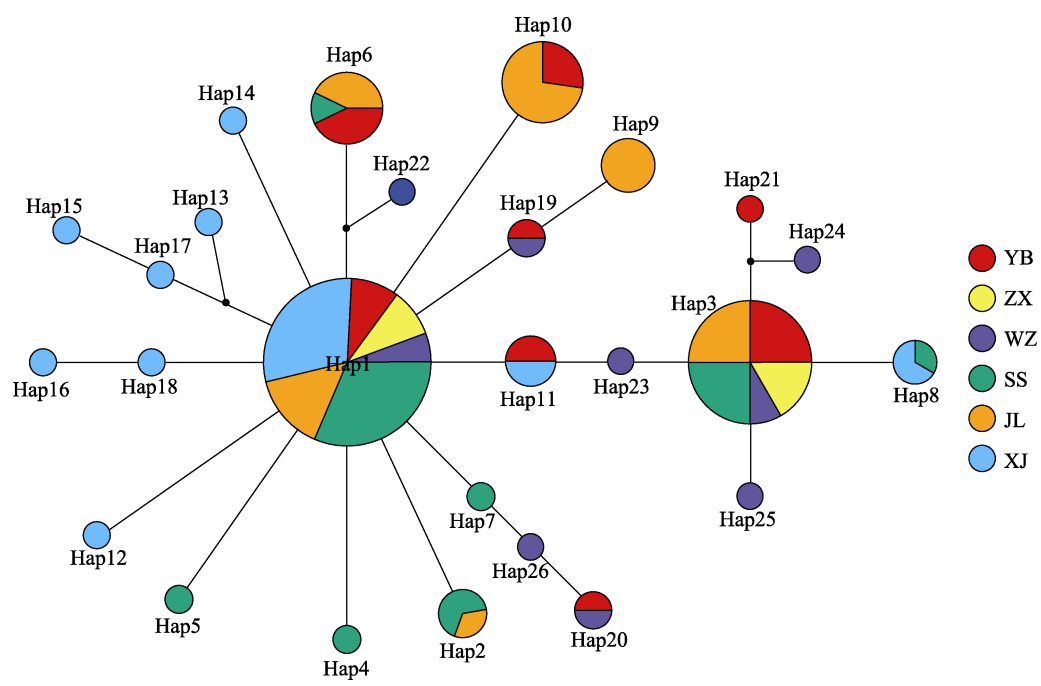


图 2 鲢 mtDNA COI 单倍型网络结构图

Fig. 2 Haplotype network of *Hypophthalmichthys molitrix* based on the COI of mtDNA

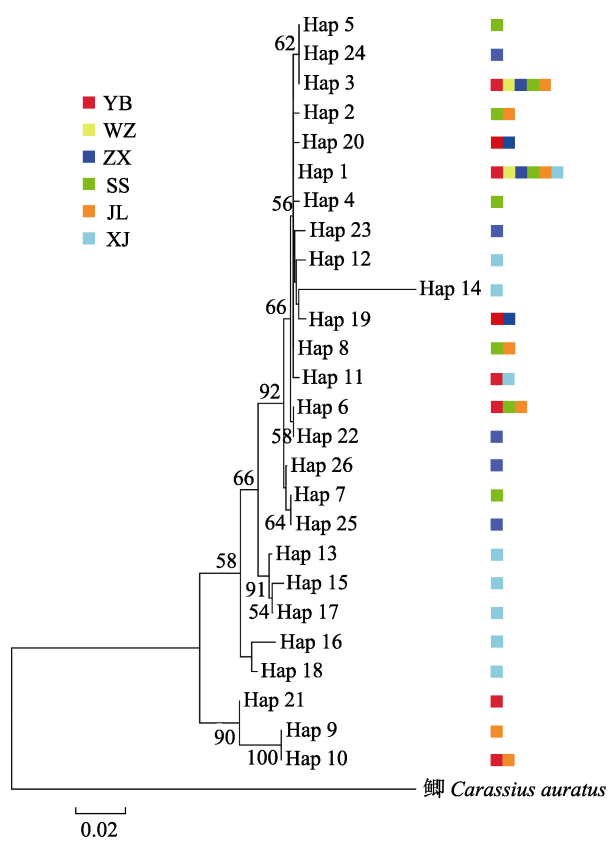


图 3 基于遗传距离模型构建的鲢单倍型 NJ 系统树
不同颜色表示单倍型所属的群体。

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree of 26 haplotypes based on genetic distance by K-2-P model
Different colors mean different population.

鲫(*Carassius auratus*, GenBank ID: KJ874428.1)为外群, 用 NJ 法建立单倍型的系统发育树(图 3)。从进化树可以看出, 单倍型分为两个主要分支, Hap9、Hap10 和 Hap21 聚为一支, 主要来自宜宾和监利群体, 其他单倍型聚为一支, 结果与单倍型网络图基本对应, 尽管这两种方法得到的结果不完全一致, 但这两个聚类图的结果均显示单倍型的聚类没有形成显著的地理格局, 群体间单倍型互相交叉分布。

3 讨论

遗传多样性是种群生存和进化的基础, 遗传多样性越丰富, 种群生存、繁衍和扩张的潜力越大, 对环境变化的抵抗和适应能力就越强^[22]。单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(π)这两个指标常用来反映群体的遗传多样性, 核苷酸多样性的累积时间远大于单倍型多样性, 在一定程度上比单倍型多样性更能反映群体的遗传多样性^[23]。本研究通过 COI 基因对长江中上游 6 个不同地理群体鲢进行遗传多样性分析, 从整体上看, 6 个群体总体单倍型多样性(H_d)为 0.785, 总体核苷酸多样性(π)为 0.00524, 与长江其他常见经济鱼类线粒

体 DNA 遗传多样性相比较, 长江鲢单倍型多样性高于草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) ($H_d=0.5855$)^[24]而低于青鱼(*Mylopharyngodon piceus*) ($H_d=0.950$)^[25]和铜鱼(*Coreius heterodon*) ($H_d=0.9257$)^[26], 核苷酸多样性均高于草鱼($\pi=0.00201$)和铜鱼($\pi=0.00417$), 但低于翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) ($\pi=0.00717$)^[27]和鳊(*Hemiculter leucisculus*) ($\pi=0.03289$)^[28], 总体上长江鲢具有较高的遗传多样性($\pi>0.005$), 与微卫星研究结果基本一致^[7-8]。Grant 等^[23]曾将单倍型多样性和核苷酸多样性之间的关系分为 4 种类型, 本研究中宜宾、万州和监利群体表现出的高 H_d 高 π 型($H_d>0.5$, $\pi>0.005$), 石首和湘江群体属于高 H_d 低 π 型($H_d>0.05$, $\pi<0.005$), 忠县群体则属于低 H_d 低 π 型。根据 Grant 等^[23]的理论, 生境广阔、大而稳定的群体通常表现出高 H_d 高 π 型, 可以推测宜宾、万州和监利这三个群体种群大小较稳定。石首和湘江群体可能经历过快速的历史扩张, 短时间内随着种群数量的急剧增加, 单倍型多样性增加, 而核苷酸的变异速率较慢, 尚没有充足的时间来积累核苷酸变异, 从而表现出高 H_d 低 π 型。忠县群体可能经历过瓶颈效应或奠基者效应, 由单一或少数个体所产生, 在本研究中也可能与其样本量较少有关。

遗传分化指数是反映群体遗传组成的重要参数, Freeland 等^[29]建议以 F_{st} 值 0.05、0.15 和 0.25 为限来表示遗传分化程度的大小, F_{st} 值越大则分化程度越大。长江上游三个群体宜宾、忠县、万州之间的遗传分化指数较低($-0.0200\sim 0.0288$), 三个群体之间的遗传分化不明显, 这与庞美霞等^[7]研究结果类似。中游三个群体中, 石首和湘江群体的遗传分化指数较低($F_{st}=0.0106$), 监利群体与石首和湘江群体存在明显的遗传分化, 王淞等^[30]通过 D-loop RFLP 分析发现监利群体与长沙群体存在遗传分化, 监利与湘江群体存在遗传分化可能是由于江湖阻隔导致的, 地理隔离是导致群体间出现遗传分化的重要因素, 通常情况下, 地理距离越大, 基因交流的概率会随之减小, 更容易出现遗传分化。但地理距离与遗传距离不相关的现象也有报道, 如朱晓东^[10]和郭稳杰^[31]等利用微卫星标记研究鲢的群体多样性时发现鲢群体间的

遗传距离与地理位置的远近无相关性, 刘红艳等^[32]在黄颡鱼(*Peltebagrus fulvidraco*)上的研究显示群体间遗传距离不遵循地理距离模型。在本研究中, 群体间遗传距离最大的为监利和万州, 遗传距离最小的为石首和忠县, 遗传距离的大小与群体地理距离没有明显的相关性, 这种现象是否是由于人类活动导致的有待进一步探讨。目前已有研究报道长江中上游鲢群体存在遗传分化, 如王长忠等^[8]认为万州和监利鲢群体存在显著遗传分化, 陈会娟等^[33]通过 Cyt b 和 D-loop 序列分析发现上游江津鲢群体与中游宜昌、嘉鱼和黄冈群体存在显著遗传分化, 本研究发现, 上游三个群体中, 宜宾群体、万州群体均与中游的三个群体遗传均存在显著的遗传分化, 忠县群体与监利群体存在显著的遗传分化, 与王长忠等^[8]和陈会娟等^[33]的结果相近。结合微卫星和线粒体 DNA 的研究结果, 可以初步认为长江上游和中游群体属于两个不同的种群, 其原因可能是中上游群体由不同的祖先进化而来, 也可能是由于地理隔绝和产卵场的不同使得群体间的基因交流贫乏造成的。

本研究结果显示, 长江中上游鲢分别属于两个不同的种群, 长江中上游 6 个鲢群体总体上遗传多样性较高, 为长江鲢野生资源和遗传多样性的保护提供了一定的理论依据。长江水系地域宽广, 本研究的采样地点和群体数量以及使用的分子标记仍有一定的局限性, 还需增加采样地点、样本个数, 结合其他分子标记对长江水系鲢的遗传多样性进行更加全面客观的分析, 持续对长江水系鲢种质资源进行监测和评价, 从而制定科学合理的鲢种质资源收集和原种场亲本收集原则, 以及增殖放流和资源养护措施, 以期更好地保护和挖掘利用长江鲢种质资源。

参考文献:

- [1] Fishery Administration Bureau of Ministry of Agriculture. China Fishery Statistic Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017, 25. [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017, 25.]
- [2] Li Z, Liang H W, Luo X Z, et al. A consecutive self-proliferate silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

- variety created through artificial meiotic gynogenesis[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 21-29.
- [3] Vetter B J, Cupp A R, Fredricks K T, et al. Acoustical deterrence of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Biological Invasions*, 2015, 17(12): 3383-3392.
- [4] Li S F. Changjiang River, Zhujiang River, Heilongjiang River Silver Carp, Bighead Carp, Grass Carp Germplasm Resource Research[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1990: 25-50. [李思发. 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: 25-50.]
- [5] Liu S P, Chen D Q, Duan X B, et al. Monitoring of the four famous Chinese carps resources in the middle and upper reaches of the Yangtze River[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2004, 13(2): 183-186. [刘绍平, 陈大庆, 段辛斌, 等. 长江中上游四大家鱼资源监测与渔业管理[J]. 长江流域资源与环境, 2004, 13(2): 183-186.]
- [6] Liu S P, Chen D Q, Zhang J B, et al. Studies on the natural resources reservoir of the four major Chinese carps in Laojianghe oxbow[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(6): 628-634. [刘绍平, 陈大庆, 张家波, 等. 老江河故道四大家鱼天然资源库研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(6): 628-634.]
- [7] Pang M X, Yu X M, Tong J G. The microsatellite analysis of genetic diversity of five silver carp populations in the Three Gorges Reservoir of the Yangtze River[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(5): 869-876. [庞美霞, 俞小牧, 童金苟. 三峡库区 5 个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(5): 869-876.]
- [8] 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. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1341-1348.]
- [9] Yu Y, Pang M X, Yu X M, et al. Population genetic structure of silver carp from Yangtze River, Ganjiang River and Poyang Lake based on microsatellite markers[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016, 35(6): 104-110. [于悦, 庞美霞, 俞小牧, 等. 利用微卫星分子标记分析长江、赣江和鄱阳湖鲢群体遗传结构[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(6): 104-110.]
- [10] 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.]
- [11] Chen S H, Ou Y J, Li J E. Mitochondrial DNA and its progresses in fish[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(3): 13-20. [陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(3): 13-20.]
- [12] Wang D, Chen Q W, Yang Z Y, et al. Preliminary analysis on the mtDNA COI genetic diversity of *Culter* spp. (Cyprinidae) in the Three Gorges Reservoir[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(5): 1054-1058. [王丹, 程庆武, 杨镇宇, 等. 三峡库区鲴属鱼类线粒体 COI 基因遗传多样性的初步分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(5): 1054-1058.]
- [13] Hu Y T, Jiang H, Pan T S, et al. Genetic differentiation of *Monopterus albus* population from Anhui Province in Yangtze River basin based on mitochondrial COI barcode sequence[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(2): 74-80. [胡玉婷, 江河, 潘庭双, 等. 基于线粒体 COI 序列探讨安徽长江流域黄鳝群体遗传分化[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(2): 74-80.]
- [14] Chen W, Zhang F Y, Wang J, et al. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Larimichthys crocea* in the East China Sea and Yellow Sea based on COI sequence[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1255-1267. [湛微, 张凤英, 王景, 等. 基于 COI 基因序列的东、黄海区野生与养殖大黄鱼遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1255-1267.]
- [15] Hu J, Hou X Y, Yin S W, et al. Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the south china sea revealed by COI and Cyt *b* gene analyses[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1008-1016. [胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于 mtDNA COI 和 Cyt *b* 基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1008-1016.]
- [16] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak 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: 4876-4882.
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1451-1452.
- [19] Saitoun, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular*

- Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [20] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10: 564-567.
- [21] Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(12): 2571-2581.
- [22] Ni S S, Yang Y, Liu S F, et al. Population-genetics analysis of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* based on mitochondrial Cyt *b* gene[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 432-439. [倪守胜, 杨钰, 柳淑芳, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的虾夷扇贝群体遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 432-439.]
- [23] 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: 415-426.
- [24] Wang S T, Zhang M, Dang Y F, et al. Genetic variation of mitochondrial DNA d-loop region in wild and breeding populations of grass carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(5): 947-955. [王沈同, 张猛, 党云飞, 等. 草鱼野生与选育群体线粒体DNA控制区D-loop遗传变异分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41(5): 947-955.]
- [25] Yang Z Y, Wang D Q, Chen D Q, et al. Genetic structure analysis based on the mitochondrial DNA of *Mylopharyngodon piceus*[J]. Freshwater Fisheries, 2015(2): 3-7. [杨宗英, 汪登强, 陈大庆, 等. 基于 mtDNA 序列分析青鱼群体遗传结构[J]. 淡水渔业, 2015(2): 3-7.]
- [26] Yuan J, Zhang Q Z, Li F, et al. mtDNA control region sequence variation and genetic diversity of *Coreius heterodon* (Bleeker) in the upper and middle sections of the Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 9-19. [袁娟, 张其中, 李飞, 等. 铜鱼线粒体控制区的序列变异和遗传多样性[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 9-19.]
- [27] Yu F Y. Study on genetic diversity of *Siniperca chuatsi/kneri* complex in the Yangtze River[D]. Guangzhou: Jinan University, 2011: 18-19. [余帆洋. 长江鳊和大眼鳊复合种的遗传多样性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2011: 18-19.]
- [28] Fan Q, He S P. The pattern of upper and middle Yangtze drainages shapes the genetic structure and diversity of *Hemiculter leucisculus* revealed by mitochondrial DNA locus[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(4): 627-635. [范启, 何舜平. 长江流域鳊种群遗传多样性和遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4): 627-635.]
- [29] Freeland J R. Molecular Ecology[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2005: 112-116.
- [30] Wang S, Cao X X, Taniguchi N, et al. PCR-RFLP analysis on mtDNA D-loop region of four populations of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(4): 3-9. [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): 3-9.]
- [31] Guo W J. Studies on population genetic structure and comparative genome mapping in silver carp[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013: 63-66. [郭稳杰. 鲢群体遗传结构及比较基因组作图研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013: 63-66.]
- [32] Liu H Y, Chen X H, Xiong F. Population genetic structure of *Peltebagnrus fulvidraco* in the lakes of middle and lower reaches of the Yangtze River and in Fuxian Lake of Yunnan[J]. Journal of Central China Normal University (Natural Science Edition), 2016, 50(2): 269-275. [刘红艳, 陈校辉, 熊飞. 长江中下游湖泊和云南抚仙湖黄颡鱼群体遗传结构研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2016, 50(2): 269-275.]
- [33] 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): 21-25. [陈会娟, 刘名典, 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): 21-25.]

Genetic diversity of six silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) geographical populations based on mitochondrial COI sequences

SHA Hang¹, LUO Xiangzhong¹, LI Zhong¹, ZOU Guiwei¹, LIANG Hongwei^{1,2}

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430223, China

Abstract: The silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), one of the four major Chinese carps, is widely distributed in the Yangtze, Pearl, and Heilongjiang River Basins of China. The wild silver carp populations in the Yangtze River, with an excellent production performance, is an important germplasm resource for artificial farming and breeding. Because of overfishing, habitat fragmentation, and water pollution, the natural carp populations have been continuously declining in recent years. The basic genetic background analysis of the silver carp would be theoretically and practically important for the conservation of germplasm resources and genetic improvement. In this study, mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene (COI) was sequenced to determine the genetic diversity and variation of six geographical silver carp populations: Yibin, Zhongxian, Wanzhou, Shishou, Jianli, and Xiangjiang. The amplified fragment was 648 bp in length, and a total of 26 haplotypes were defined among 123 sequences of COI from the six silver carp populations. The haplotype and nucleotide diversity index of the six populations ranged from 0.0476 to 0.0945, and from 0.00196 to 0.00982, respectively. The six groups exhibited a high genetic diversity, of which the Wanzhou population showed the highest haplotype and nucleotide diversities; the lowest haplotype and nucleotide diversities were observed in the Zhongxian and Shishou populations, respectively. The molecular variance (AMOVA) analysis showed that the variation within populations (accounting for 88.72%) was the main source of variation, and only 11.28% of the variation was found among the groups. The haplotype network was radial, centering on the main haplotype. The neighbor-joining phylogenetic tree of haplotypes based on genetic distances were inconsistent with their geographical distances. According to the differentiation index (F_{st}) between populations of *H. molitrix*, there were high differences between the Yinbin, Wanzhou, and 3 populations from the middle reach ($P < 0.05$); meanwhile, the Jianli population showed a significant differentiation from the Shishou and Xiangjiang populations ($P < 0.01$). The results revealed that the upper- and middle-reach populations should have originated from different populations in the Yangtze River. This study could provide useful basic data for the scientific protection, and reasonable and sustainable utilization of this germplasm resource in the Yangtze River Basin.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; COI; genetic structure; genetic diversity

Corresponding author: LIANG Hongwei. Email: lianghw@yfi.ac.cn