

青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性

陈大庆^{1,2}, 张春霖³, 鲁成⁴, 张信¹

(1. 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 3. 西南农业大学 水产学院, 重庆 400716; 4. 西南农业大学 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要:利用 PCR 技术扩增青海湖 3 个不同地区(黑马河、布哈河、沙柳河)的青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii* (Kessler))线粒体 D-loop 基因片段,测定该基因片段 1 005 bp 序列。通过线粒体基因组 D-loop 区序列比较分析,对比 3 个不同地区的 83 尾青海湖裸鲤的遗传结构进行研究,共检测出多态性位点 65 个,其中有 1 个插入位点(b3, nt-569), 2 个缺失位点(s6 和 b37, nt-169, nt-170),多态性位点数 62。3 个群体内的多态性位点分别为黑马河 51 个、布哈河 38 个、沙柳河 39 个,平均核苷酸位点差异数分别为 9.377、7.782 和 7.510。结果表明,不同地区的遗传距离分别为黑马河群体与布哈河群体间的平均遗传距离最小(0.010 93),布哈河群体与沙柳河群体次之(0.014 23),黑马河群体与沙柳河群体的遗传平均距离最大(0.019 09)。3 个群体间的遗传平均距离都在 0.01 以上,而且 3 个群体间总的遗传分化指数为 0.019 26,基因流为 12.73。UPGMA 法构建的分子系统树中,沙柳河群体聚成一支,黑马河和布哈河群体混杂在一起,聚成一支。从序列差异的分析中得出,沙柳河群体与黑马河和布哈河群体的亲缘关系较远;黑马河和布哈河群体亲缘关系较近。以上数据还表明,青海湖裸鲤 3 个繁殖群体间具有较弱的遗传分化,洄游到同一河流里进行交配繁殖的群体内基因交流作用比较大,而洄游到不同河流进行繁殖的群体间的基因交流相对较小。[中国水产科学, 2006, 13(5): 800-806]

关键词:青海湖裸鲤;线粒体基因组 D-loop 区;遗传多样性

中图分类号: Q959.468 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0800-07

线粒体 DNA 母系遗传具有较高的突变率。突变固定后形成的多态性位点可反映出群体遗传特征、种群分化和种属关系等特点^[1],是系统进化和种群遗传研究的理想材料。而 mtDNA 的 D-loop 区域是线粒体中唯一的非编码区,不受选择压力的影响,进化速度比较快,遗传变异较大,非常适合种群水平的群体遗传分析^[2-4]。

青海湖裸鲤 [*Gymnocypris przewalskii* (Kessler)],生活在青海湖及其附属水系中,属鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)、裸鲤属(*Gymnocypris* Günther, 1868),是青海湖中唯一的经济鱼类,于 1976 年经国务院批准为中国重要名贵水生动物。已有研究显示,无论是形态特征、蛋白质、基因组,还是 mtDNA,青海湖裸鲤都具有丰富的遗传多样性^[5-10],反映了青海湖裸鲤这种高原鱼类特殊的生命进化历程和适应高原复杂环境的能力。目前,青海湖裸鲤种群正

处于剧烈衰退之中,影响了整个青海湖地区的生态平衡^[11-12]。但是如何恢复其种群数量、合理地进行种群数量的补充,特别是在不影响其自然的遗传性状和群体遗传多样性的前提下实现该种群的增长和恢复是当前急需深入研究并加以解决的问题。制定一个建立在科学的理论依据之上的种群保护和人工放流措施,需深入对其遗传多样性和各个自然群体之间遗传关系进行研究和分析。本研究采用序列扩增技术从线粒体 DNA 高变区 D-loop 区的核苷酸变异水平对青海湖裸鲤遗传结构进行分析,以期为其群体遗传多样性评估和资源保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

青海湖裸鲤样品于 2002 年 7 月青海湖裸鲤湖河繁殖期间,分别采集于黑马河、布哈河以及沙柳河,从 3 条河流的地理位置来看(图 1),布哈河位于

收稿日期:2005-04-15;修订日期:2006-02-12。

基金项目:青海省科技厅“十五”攻关项目(2001-N-122);淡水生态与生物技术国家重点实验室开放项目(2003FT02)。

作者简介:陈大庆(1964-),男,研究员,主要从事鱼类生态学研究。Tel:0716-8130008, E-mail: chdq@yf. ac. cn

黑马河与沙柳河之间,而沙柳河与黑马河、布哈河之间距离较远。每条河流各随机取 30 尾,活鱼解剖,取肌肉 3~5 g 于无水乙醇中浸泡保存。



图1 青海湖各支流分布情况

Fig.1 Distribution of the tributaries of the Qinghai Lake

1.2 DNA 的提取

取约 0.1 g 肌肉,提取基因组总 DNA。其提取方法参照标准平衡酚——氯仿抽提程序进行。提取完毕后,得到的 DNA 充分溶解于适量的 TE 8.0 中,并通过琼脂糖电泳测定其浓度。

1.3 D-loop 基因片段的 PCR 扩增

根据 GenBank 的鲤科鱼类 mtDNA D-loop 区两端 tRNA-pro 和 tRNA-phe 的核酸序列进行比较,取同源性最高的区段设计简并引物,其序列如下:

tRNA-pro: 5' aactc(ta)ccccctg(ga)ct(ac)ccaa3'

tRNA-phe: 5' cctttgtgcatgcccag(agt)tt 3'

PCR 反应总体积为 50 μ L, 其中 10 $\times$ Ex Tap Buffer (Takara) 5 μ L, Ex Tap polymerase (Takara)

0.3 μ L, Dntp [(2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹) Takara] 4 μ L, 10 pmol $\cdot$ L⁻¹ 引物 2 μ L, 1 μ L 模板 DNA, 其余为灭菌蒸馏水。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 60 s, 56 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环, 得到 1 条单一的扩增条带, 用于直接测序(其中沙柳河测定了 30 个个体, 黑马河 30 个个体, 布哈河 23 个个体)。回收纯化后的 PCR 产物由大连 TAKARA BIOTECH 公司完成。

1.4 数据处理

经过测序得到的 83 个序列采用 Clustw 软件进行序列比较, 除去多余的碱基片段, 所有序列均取 1 005 bp。然后根据公式 $F = 2N_{xy}/N_x + N_y$, $D = 1 - F$, $G_m = (H_T - H_{pop})/H_T$ 和 $N_m = 0.5(1 - G_m)/G_m$ (式中 N_{xy} 代表 X、Y 2 个个体共有的扩增带, N_x 、 N_y 是 X 与 Y 个体各自所有的扩增带; H_T 为总群体的平均多样性, H_{pop} 为各群体多样性的平均值) 来计算 Nei's 遗传相似指数^[13]、Nei's 遗传距离、遗传分化指数和基因流, 采用 DnaSP3.99 软件进行总的遗传多样性和群体遗传变异分析。

2 结果

2.1 总群体的序列多样性

经过序列比较分析, 在 83 个个体中共产生了 65 个核苷酸位点的变异(图 2 和图 3), 其中有 1 个插入位点(b3, nt-569), 2 个缺失(s6 和 b37, nt-169, nt-170), 多态性位点数 62。核苷酸多样性指数 $P_i = 0.00823$, 平均核苷酸差异数 $K = 8.242$ 。单倍型数 $H = 71$, 单倍型基因多样性指数 $H_d = 0.992$ 。

[1]	nt_2	[2]	nt_12	[3]	nt_16	[4]	nt_28	[5]	nt_35
[6]	nt_36	[7]	nt_41	[8]	nt_46	[9]	nt_48	[10]	nt_50
[11]	nt_58	[12]	nt_78	[13]	nt_81	[14]	nt_106	[15]	nt_114
[16]	nt_121	[17]	nt_125	[18]	nt_145	[19]	nt_148	[20]	nt_169
[21]	nt_170	[22]	nt_179	[23]	nt_202	[24]	nt_222	[25]	nt_302
[26]	nt_307	[27]	nt_315	[28]	nt_323	[29]	nt_358	[30]	nt_364
[31]	nt_379	[32]	nt_396	[33]	nt_399	[34]	nt_401	[35]	nt_413
[36]	nt_432	[37]	nt_540	[38]	nt_550	[39]	nt_559	[40]	nt_569
[41]	nt_582	[42]	nt_597	[43]	nt_598	[44]	nt_606	[45]	nt_607
[46]	nt_610	[47]	nt_665	[48]	nt_668	[49]	nt_671	[50]	nt_688
[51]	nt_712	[52]	nt_741	[53]	nt_744	[54]	nt_750	[55]	nt_760
[56]	nt_761	[57]	nt_762	[58]	nt_777	[59]	nt_790	[60]	nt_846
[61]	nt_867	[62]	nt_878	[63]	nt_885	[64]	nt_934	[65]	nt_977

图2 青海湖裸鲤所有个体产生核苷酸变异的位点

Fig.2 Nucleotide locations of aberrance of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler)

	10	20	30	40	50	60
h1	CTTCTTGCAC	TTTAACATAT	GGTGTGTG	GATACACG	-AGAGTTGGC	TTTGAAGATTGTGGC
h2			AT	AAAC		
h3		T	AT	AA CA	G	T - A ACAA
h4			TT	AAAC	A	A - C
h5			AT	AAAC		-GA
h6		T	AT	AAACA	GC	T - A ACAA
h7		T	AT	TAAACA	GC	- A A A AA
h8		T	TC	AAACA	GC	- A T A C A A
h9		T	AT	AAA	G	-
h13			AT	AAAC		-GA
h14s	A T	C C	C	AT	AAA	-
h15	A	C	AT	AAAC		-G C
h16	AA A	C	AT	AAA		-
h17	A A	C	G	AT	AAA	T -
h18	A	CC	G	AT	AAAC	-GA
h19	G	C GC	G	AT	AAAC	G T - G
h20	A	G	AT	AAAC		-G C
h21	A	G	AT	AAA		-G C G
h22	A		AT	AAAC		-G C G
h23		C	G	AT	AAA	-
h24	A	T	C	AT	AAACA	GC T - C A ACAA
h25			AT	AAA		-
h26	ACA	C	G	AT	AAA	-
h27			AT	AAAC		-GA
h28		G	AT	AAAC		- C T
h29			AT	AAAC		- C T
h30	A A	T	C	G	AT	AAACA GC T - A ACAA
h31	A	T	C	AT	AAACA GC	T - A ACAA
h32	A A	C	AT	AAA		-
h33	A		AT	AAAC		-GA
h2			AT	AAAC		-GA
h4			AT	AAA		-
h5		T	AC	C		- C T
h6			-AT	AAAC		- C T
h7			AT	AAA		-
h8			AT	AAAC		-G
h9			AT	AAA		-
h10			AT	AAAC		-GA
h11			AT	AA		-
h12			AT	AAAC		A - C
h13s	A	C	AT	AAAC		-G C C
h14	A		AT	AAAC		-G C C
h15		C T	AT	AAAC	G	-G G
h16		T	C	AT	AAACA GC	T - A ACAA
h17		C	AT	AAAC	G	-GA
h18	A	C	AT	AAAC		-GA
h19	A	T	AT	AAACA GC	T	- A ACAA
h20	A	C	AT	AAAC	A	- A A
h21	A		AT	AAA		-
h22	A	T	AT	AAAC	G	-G
h23	A		AT	AAAC		-G
h24	G A	C	C	AT	AAAC	-GA
h25	A A	C C	C T	G	AT	AAAC C - C T
h26	A A	T	C C	G	AT	AAACA GC T - A ACAA
h27			G	AT	AAAC	-GA
h28	A A	C	G	AT	AAAC	-GA C
h29	A A	T	C	G	AT	AAACA GC - A A C A AA
h30	A	C	G	AT	AAAC	A - C
h31	A		AT	AAAC	C	- C T
h32	A	C	C	AT	AAA	-
s1			AT	AAA		-
s2		T	AT	AAACA	GCG	T - A ACAA
s3			AT	AAA	AG	CA
s4			AT	AAA		A
s5			AT	AAA	T	- G
s6			AT	AAAC	G	-GA

图3

待续

Fig. 3

To be continued

s21	...	A	...	AC	...	G	...	AT	...	AAAC	...	A	...	A	...	C	...						
s22	...	A	...		...	G	...	AT	...	AAAC	...		...	-GA	...		...						
s24	...	A	A	...	C	...	G	...	AT	...	AAAC	...	A	...	-G	...	G	...					
s25	...	A	C	C	...	C	...	G	...	AT	...	AAAC	...		...	C	...	T	...				
s27	...	A	C	C	...	C	...	G	...	AT	...	AAAC	...		...	-G	...	A	...				
s29	...	A	A	...	C	...		...	AT	...	AAAC	...		...	-GA	...		...					
s30	...	A	...	C	...	G	...	AT	...	AAAC	...		...	-G	...	C	...	C	...				
s31	...	A	...	C	...		...	AT	...	AAA	...		...	-	...		...		...				
s33	...	A	...		...		...	AT	...	AAAC	...		...	-G	...	C	...	G	...				
s34	...	A	A	...	C	...	G	...	AT	...	AAAC	...		...	-G	...		...					
s35	...	A	...	C	...	C	...		...	AT	...	AAAC	...		...	-G	...	C	...	G	...		
s36	...	A	...	C	...		...		...	AT	...	AAAC	...	GC	...	-G	G	...					
s37	...		...		...		...	-AT	...	AAA	...		...	-	...		...						
s40	...	A	...	C	...	G	...		...	AT	...	AAAC	...	G	...	T	...		G	...			
s43	...	A	A	...	C	...		...		AT	...	AAA	...		...	-	...						
s44	...		...	T	...		...		...	AT	...	AAACA	...	GC	...	-	...	A	...	A	C	A	AA
s46	...	A	...		...		...		...	AT	...	AAAC	...		...	A	...	-A	...	A	...		

图3 青海湖裸鲤所有个体的核苷酸替代情况

Fig.3 Displace of nucleotide of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler)

2.2 各群体内的序列多样性

2.2.1 沙柳河群体的序列多样性 在沙柳河群体内有 39 个核苷酸位点的变异。其中有 1 个缺失(s6, nt-169),有 1 个插入(b3, nt-569)多态性位点数 39。 $H=22$, $H_d=0.996$, $P_i=0.00749$, $K=7.50988$ 。

2.2.2 黑马河群体的序列多样性 黑马河群体共产生 51 个变异位点,没有插入与缺失,多态性位点数 49。 $H=28$, $H_d=0.99310$, $P_i=0.00936$, $K=9.37701$ 。

2.2.3 布哈河群体序列多样性 布哈河群体有 38

个变异位点,其中有 1 个缺失(b37, nt-170),多态性位点数 38。 $H=27$, $H_d=0.99080$, $P_i=0.00777$, $K=7.78161$ 。总的看来,黑马河群体遗传多样性明显较高,沙柳河群体与布哈河群体相当多样性都要低一些(表 1)。

2.3 青海湖裸鲤群体间的遗传分化

由表 2 可以看出青海湖裸鲤群体间的 mtDNA D-loop 区的核苷酸变异水平较高,群体间产生了比较弱的遗传分化。

表1 青海湖裸鲤各群体的遗传多样性参数比较

Tab.1 Genetic diversity between any populations of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) in Qinghai Lake

项目 Item	沙柳河 Shaliu River	黑马河 Heima River	布哈河 Buba River	总计 Total
n	23	30	30	83
H	22	28	27	71
H_d	0.996	0.993	0.9908	0.992
S	39	49	38	62
K	7.510	9.377	7.782	8.242
P_i	0.00749	0.00936	0.00777	0.00823

注: n —个体数; H —单倍型数; H_d —单倍型多样性指数; S —多态性位点数; K —平均核苷酸差异数; P_i —核苷酸多样性指数。

Note: n —number of individuals; H —Haplotype; H_d —Haplotype diversity index; WTDX; S —Sites of diversity; K —Average nucleotide differences; P_i —Polymorphic index.

表2 青海湖裸鲤各群体间的遗传分化

Tab.2 Genetic differentiation between any populations of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) in Qinghai Lake

Pop1	Pop2	H_i	K_i	K_{xy}	G_{st}	D_{xy}	D_i
Heimahe	Bubahe	0.99195	8.57931	8.47667	0.01093	0.00846	0.0008
Heimahe	Saliuhe	0.99437	8.56675	8.45073	0.01909	0.00843	0.00014
Bubahe	Saliuhe	0.99305	7.66369	7.56957	0.01423	0.00755	0.00010

从各个群体间的遗传分化指数分析,黑马河群体与沙柳河群体间的分化程度较高,沙柳河群体与布哈河群体的分化程度其次,黑马河群体与布哈河群体间的分化程度最小;另外,根据 Nei^[13]方法计算出青海湖裸鲤各群体间总的分化指数为 0.019 26,基因流 12.73,各个繁殖群体间还具有一定程度的基因交流。

2.4 群体间的亲缘关系及聚类分析

从图 4 的聚类分析和表 2 可以看出,黑马河群体和布哈河群体的遗传相似性为最高,布哈河与沙柳河群体次之,相似性最小的是黑马河与沙柳河。这可能是由于黑马河群体与布哈河群体的基因交流要比它们与沙柳河群体之间的交流更为频繁,所以聚类图上显示黑马河群体和布哈河群体的关系更近。



图 4 三个群体间的 UPGMA 聚类分析

Fig.4 UPGMA cluster analysis of the three populations

3 讨论

3.1 青海湖裸鲤群体内的基因多样性

遗传多样性的研究是生物多样性研究的重要内容,只有通过遗传多样性的研究才能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化。已有的研究显示了青海湖裸鲤在形态特征、蛋白质、基因组以及 mtDNA 水平上都具有丰富的遗传多样性^[5-10],反映了青海湖裸鲤这种高原鱼类特殊的生命进化历程和适应高原复杂环境的能力。

从实验结果看,青海湖裸鲤 83 个个体 mtDNA 的 D-loop 区 1 005 bp 的总核苷酸突变位点为 65 个,说明该物种具有较高水平的遗传多样性和环境适应能力。另外,从 3 个繁殖群体内部的核苷酸位点突变情况来看,沙柳河群体内有 39 个核苷酸位点的变异,黑马河群体共产生 51 个变异位点,布哈河群体有 38 个变异位点,分别只占总群体变异的 60%、78.5% 和 58.5%。表明遗传变异主要存在于群体内,群体间的基因变异较弱。黑马河群体的基

因多样性水平最高,布哈河和沙柳河群体较低。另外,从 3 个群体所产生的多态性位点比例看,沙柳河群体也比其他 2 个群体具有更高的遗传均质性。

3.2 青海湖裸鲤群体间的基因多样性

群体间的遗传距离以及种群分化指数是衡量群体多态程度的重要指标,二者的值越大,群体多态性程度越高。根正利^[14]利用遗传相似指数 IN 和遗传距离 D 值对物种的不同分类单位间的遗传分异水平作过定量性估计,并指出种群间遗传距离 D 值的范围是 0—0.05;亚种间是 0.02—0.2。Shaklee 等^[15]综合已发表的资料,提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离 D 值分别为 0.9、0.30 及 0.05 的分类依据。本实验统计结果表明,3 个群体间的遗传平均距离为 0.01—0.02,黑马河群体与布哈河群体间的平均遗传距离最小(0.010 93),布哈河群体与沙柳河群体次之(0.014 23),而黑马河群体与沙柳河群体的遗传距离最大(0.019 09),这反映出布哈河群体与黑马河群体间的基因流较比沙柳河群体间的基因流大,表明它们之间的遗传分化达到了种群的分化标准。其遗传变异程度较小,群体间的分化程度不大。但是,考虑到这是在 1 个湖泊中的 3 个不同的生殖洄游群体间所产生的遗传分化,可以认为青海湖裸鲤已经建立起了一种相对稳定的生殖洄游模式,交配对象之间具有一定的相对稳定性。由此可以说明,由于青海湖裸鲤存在着生殖洄游的习性,而且洄游到不同的河流中进行产卵繁殖,因此洄游到同一河流里进行交配繁殖的群体内基因交流作用比较大,而洄游到不同河流进行繁殖的群体间的基因交流相对较小。

3.3 遗传多样性与青海湖裸鲤的资源保护

物种的濒危原因主要是栖息地破坏、污染、生境退化和生物资源的过度利用。遗传变异丰富的种群在环境变迁中有较大的适应能力,但是过度的开发利用所导致的遗传多样性的丧失将危机其自身的延续能力,加快物种的濒危。因此,有计划地开发利用青海湖裸鲤资源,或采取建立基因库的保护办法,是保持其进化潜力,适应不同生境,以及可持续利用的前提。

现在,青海湖每年都进行大量裸鲤人工增殖放流,但是人工增殖放流所有亲本均来自于沙柳河,随着时间的推移必将对青海湖裸鲤资源遗传结构产生影响。因此,在裸鲤人工增殖放流过程中,应采用多水系裸鲤亲本,同时加大对布哈河繁殖群体的保护

力度,监测各种资源,恢复给青海湖裸鲤的遗传多样性所产生影响的措施,对种质资源的纯度和数量进行检验,以有效地保护和恢复青海湖裸鲤资源。

参考文献:

- [1] Cano R L, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA[J]. *Genetic*, 1984, 106: 479-499.
- [2] Gati M H, Ferguson M M, Liskauskas A P. Comparison of control region sequencing and fragment RFLP analysis for resolving mitochondrial DNA variation and phylogenetic relationships among Great Lakes Walleyes[J]. *Trans American Fish Soc*, 2000, 129(6): 1288-1299.
- [3] Zardoya R, Meyer A. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibia: Gymnophiona)[J]. *Genetics*, 2000, 2: 765-775.
- [4] Rosel P E, Diaon A E, Haygood M G. Variability of the mitochondrial control in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocaena*, on interoceanic and regional scales[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995, 52: 1421-1429.
- [5] 朱松泉,武云飞. 青海湖地区的鱼类区系和青海湖裸鲤的生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1975. 3-16.
- [6] 周虞灿. 青海湖裸鲤血清蛋白以及血红蛋白多态性的分析[J]. *高原生物学集刊*, 1984, 13(2): 125-131.
- [7] 赵 凯. 青海湖裸鲤与草鱼遗传变异性比较[J]. *淡水渔业*, 2001, 31(2): 51-52.
- [8] 祁得林,李军祥. 青海湖裸鲤血清过氧化物酶多态性初步研究[J]. *淡水渔业*, 2002, 32(5): 57-58.
- [9] 张武学,张才敏,李军祥. 青海湖裸鲤乳酸脱氢同工酶的研究[J]. *青海畜牧兽医学杂志*, 1994, 24(3): 9-12.
- [10] 赵 凯,张亚平,张武学,等. 青海湖裸鲤 mtDNA 遗传多样性的初步研究[J]. *遗传*, 2001, 23(5): 445-448.
- [11] 陈民琦,应百才. 青海湖封湖 3 年对裸鲤种群结构的影响[J]. *青海师范大学学报(自然科学版)*, 1990, (1): 50-56.
- [12] 张玉书,陈 璞. 青海湖裸鲤种群数量变动的初步分析[J]. *水产学报*, 1980, 4(2): 157-177.
- [13] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races[J]. *Human Genetics*, 1978, 23(4): 341-369.
- [14] 根井正利. 分子群体遗传学与进化论[M]. 北京: 农业出版社, 1975. 121-133.
- [15] Shaklee J B, Jhon C D. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoresis analysis of proteins[J]. *Pac Sci*, 1982, 36: 141-157.

Polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial genomes of different broodstocks of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler)

CHEN Da-qing^{1,2}, ZHANG Chun-lin³, LU Cheng⁴, ZHANG Xin¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Fisheries College, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China; 4. Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The Qinghai Lake is the largest inland brackish water lake in China with a high salt and alkali contents, covering an area of 4 456 km² and being located 3 200 meters above sea level. It is located in the north-east of the Qinghai-Tibet Plateau, where the climate is cold and the freezing season is long. *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) is a brackish and cold water fish species peculiar to the Qinghai Lake and its tributaries which has evolved in the long period of geographical isolation of the water system of the Yellow River having significant migration for reproduction. Every year, it ascends to the tributaries for spawning from March to July. It has low fecundity. It is omnivores, feeding on planktons and the insects fallen into the water. It is economically an very important fish species in the area of the Qinghai Lake. In recent decades, the deterioration of ecological environments (such as dryness of the inflowing rivers, sharp decline in precipitation, decrease in water level, increase in evaporation and salt contents of the lake water etc.) and over-fishing in the Lake area have led to a decrease of their stock abundance by 90% in comparison with that at the beginning of its exploitation. Now, it has become an endangered fish and listed as the state-protected rare species. Judging from phenotypic characters, there exists a rather large variability within the

species, which is reflected in the variabilities in their feeding organs, such as the number of gill-rakers, the position of mouth and the lengths of intestines. These are consistent with the character of omnivory that has been formed in their survival environment for the paucity of food organisms. Besides, there are considerable variabilities in body form and body color. In this study, PCR (polymerase chain reaction) technique was used in an attempt to analyze the genetic structure of this fish species at mitochondrial D-loop level, in order to provide a new base for the assessment and protection of its population genetic diversities.

The materials used in this experiment were collected from the Heima River, the Buha River and the Shaliu River, in July, 2002, when *G. przewalskii* ascended for reproduction, with a total of 45 specimens, ie 15 samples from per river. 3–5 g of muscle tissue per individual was taken for preservation in anhydrous alcohol. The mitochondrial D-loop of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) from different districts (the Heimahe River, the Buhahe River and the Shaliuhe River) of the Qinghaihu Lake were amplified by using polymerase chain reaction (PCR) technique, its sequence being determined to be 1 065 bp. A research was conducted on the genetic structure of 83 individuals from the 3 districts through a comparative analysis of D-loop sequence of their mitochondria genome. A total of 65 polymorphic sites were detected, including an insertion site (b3, nt-569), two deletions (s6 and b37, nt-169 and nt-170) and 62 polymorphic sites. The number of polymorphic sites are 51 for the Heimahe population (Hm), 38 for the Buhahe population (Bh) and 39 for the Shaliuhe population (Sl), respectively, with the different number of average nucleotide sites of the three population being 9.377, 7.782 and 7.510, respectively. The results showed that the genetic distance between Hm and Bh was the smallest (0.010 93), between Bh and Sl secondly (0.014 23), and between Hm and Sl the largest (0.019 09). The genetic distance between any two populations was all above 0.10, and the total genetic differentiation index of the three population was 0.019 26. The gene flow Nm was 12.73. In the molecular phylogenetic tree constructed in the method of UPGMA, Sl aggregated a branch, and Hm and Bh were mixed together, aggregating into another branch. Judged by sequence difference analysis, Sl was more distantly related up Hm than to Bh, while Hm and Bh were more closely related. The above data also showed that there existed quite a weak genetic differentiation and quite a strong gene exchange among the three population simultaneously. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13 (5): 800–806]

Key words: *Gymnocypris przewalskii* (Kessler); mitochondria genome D-loop region; genetic diversity