

不同倍性团头鲂群体的线粒体 DNA 分析

唐首杰, 李思发, 蔡完其

(上海水产大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 测定了来自 5 个不同倍性团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 群体 (4n-F₁、正交 3n、反交 3n、异源 3n、二倍体 2n) 57 个个体的线粒体 DNA 控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因和 CO II 基因序列, 通过对这 4 段基因序列的联合分析, 研究了 5 个不同倍性团头鲂群体的遗传变异。这 4 个基因片段的长度分别为: 控制区 937 bp, 细胞色素 *b* 基因 1 140 bp, 16S rRNA 基因片段 564 bp, CO II 基因片段 642 bp。将 4 个基因片段合并为 1 条总长度为 3 283 bp 的片段; 在这条 3 283 bp 片段中, T、C、A、G 4 种核苷酸的平均含量分别为 27.18%、25.45%、30.71%、16.66%。57 个个体中确定了 55 种单倍型, 未发现群体间有共享的单倍型, 五群体的单倍型多样性在 0.984 8~1.000 0 之间, 显示不同倍性团头鲂群体内单倍型类型丰富。5 个群体内各序列平均核苷酸差异数 (*K*) 在 8.000~24.273 之间, 核苷酸多样性指数 (π) 在 0.248 3%~0.786 6% 之间; 群体间遗传距离范围为 0.003 9~0.010 6, 显示不同倍性团头鲂群体遗传多态性丰富。核苷酸多样性指数 (π)、平均核苷酸差异数 (*K*) 和核苷酸序列间平均遗传距离在 5 个群体间的变化趋势一致, 由大到小依次为反交 3n、异源 3n、正交 3n、同源 4n-F₁、二倍体 2n。而且, 反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的核苷酸多样性指数 (π)、平均核苷酸差异数 (*K*) 以及核苷酸序列间平均遗传距离均显著大于 2n 群体 ($P < 0.05$)。结果表明, 反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的遗传多样性水平显著高于 2n 群体。[中国水产科学, 2008, 15 (2): 222~229]

关键词: 团头鲂; 倍性; 线粒体 DNA; 遗传变异

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0222-08

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 系草食性鱼类, 为中国重要养殖种类, 2005 年养殖产量达 55 万 t。在团头鲂“浦江 1 号”良种^[1-2]的基础上, 2000 年以来通过诱导和筛选, 上海水产大学水产动物种质资源研究室建立了雌雄均可育的同源和异源团头鲂四倍体奠基群体^[3]。与二倍体团头鲂相比, 四倍体团头鲂及其与二倍体杂交后代在早期存活率、生长性能、性腺发育等特征^[4]以及微卫星遗传特征^[5]等方面都存在很大程度的变异性。

鱼类线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 同其他脊椎动物的 mtDNA 一样, 具有分子小、结构简单、母系遗传、进化速度快等特点, 它已成为鱼类进化遗传学、分子生态学、遗传多样性及其保护生物学等研究的重要标记^[6-8]。

关于多倍体鱼类线粒体 DNA 群体遗传变异的报道较少, 郭新红^[9]运用线粒体 tRNA-Thr 基因、tRNA-Phe 基因以及从 5' 端开始的大部分控制区

序列对异源四倍体鲫鲤和三倍体湘云鲫种群遗传多样性进行了检测。郭新红等^[10]还利用线粒体 12S rRNA 基因全序列分析了异源四倍体鲫鲤、三倍体湘云鲫和其父母本的遗传变异。但迄今为止, 尚未见有关不同倍性团头鲂线粒体 DNA 群体遗传多样性方面的报道。

本研究试图通过对线粒体控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因和 COII 基因序列的联合分析, 及时监测团头鲂多倍体群体内的遗传变异, 旨在建立团头鲂四倍体种质库提供参考资料, 并为选育不育的团头鲂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

团头鲂人工同源四倍体自繁 F₁ (4n-F₁) 为 4n ♀ × 4n♂ 后代; 正交同源三倍体 (正交 3n) 为 4n ♀ × 2n♂ 后代; 反交同源三倍体 (反交 3n) 为 2n

收稿日期: 2007-07-06; 修订日期: 2007-09-06.

基金项目: 上海市农委科技兴农重点攻关项目 (No.03-143).

作者简介: 唐首杰 (1981-), 男, 博士研究生, 专业方向为水产动物种质资源与种苗工程. Tel: 021-65710062; E-mail: tangshoujie@yahoo.com.cn

通讯作者: 李思发 (1938-), 博士生导师, 主要从事水产动物种质资源研究. Tel: 021-65710333; E-mail: sfli@shfu.edu.cn

♀ × 4n♂ 后代; 异源 3n 为团头鲂 2n ♀ × 异源 4n [团头鲂 ♀ × 三角鲂 (*Megalobrama terminalis*, ♂)]♂ 后代; 二倍体 (2n) 为团头鲂“浦江 1 号”, 共 5 种倍性的团头鲂群体。以下分别用“同源 4n-F₁”、“正交 3n”、“反交 3n”、“异源 3n”和“2n”表示。

所有材料均取自上海水产大学南汇水产动物种质资源试验站。逐尾尾静脉抽血 (<5 μL), Coulter-Counter 颗粒分析仪 (Coulter Counter, Beckman-

Coulter Company, USA) 测量红细胞体积, 确定鱼的倍性^[11]。随机取异源 3n 鱼 9 尾, 其他倍性鱼各 12 尾, 5 群体共 57 尾, 剪取鳍条, 95% 乙醇固定。

1.2 PCR 扩增和序列测定

基因组 DNA 提取采用常规的“酚-氯仿”法^[12]进行。采用鲤科鱼类的通用引物^[13-16]分别扩增线粒体控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因和 CO II 基因 (表 1)。

表 1 4 对鲤科鱼类线粒体 DNA 通用引物的序列和退火温度^[13-16]

Tab.1 Sequences and annealing temperatures of four cyprinids mitochondrial DNA universal primers

扩增片段 Amplified fragment	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 /℃ Annealing temperature
线粒体 DNA 控制区 Mitochondrial DNA control region	DL1: ACC CCT GGC TCC CAA AGC	51.6
	DH2: ATC TTA GCA TCT TCA GTG	
线粒体 DNA 细胞色素 <i>b</i> 基因 Mitochondrial DNA cytochrome <i>b</i> gene	L14724: GAC TTG AAA AAC CAC CGT TG	56.0
	H15915: CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC	
线粒体 DNA 16S rRNA 基因 Mitochondrial DNA 16S rRNA gene	L2510: CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT	57.1
	H3080: CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	
线粒体 DNA COII 基因 Mitochondrial DNA COII gene	AGC TTC CTA GCG AGG CGT CTT	50.4
	TAA TGG CAC ACC CAA CGC AAC	

PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 2 min, 94 ℃ 30 s, 51.6 ℃ (控制区)/56.0 ℃ (细胞色素 *b* 基因)/57.1 ℃ (16S rRNA 基因)/50.4 ℃ (CO II 基因) 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经 2.0% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳回收纯化。样品委托上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序, 序列测定仪为美国 ABI 公司 377 型全自动序列分析仪。

1.3 数据处理和分析

用 BLAST 软件^[17]搜索 GenBank 中鲤 (*Cyprinus carpio*, 序列登录号: X61010) 的线粒体 DNA 控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因和 CO II 基因序列, 与不同倍性团头鲂的序列结果进行同源性比较; 然后用 BioEdit 软件^[18]对测序结果进行编辑, 以 CLUSTL W 软件^[19]进行序列重排和同源比较, 并进行人工核对校正。用 PAUP* 4.0b10 软件^[20]进行控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因片段和 CO II 基因片段的分区同质性

检测 (Partition homogeneity test)^[21]。用 Arlequin 3.01^[22]和 DNASP4.0 软件计算单倍多样度和核苷酸多样性; 用 MEGA 3 软件包^[23]中的 Kimura Two-Parameter 法计算群体内及群体间核苷酸序列两两间的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物序列测定及排序结果

4 个基因片段在不同倍性团头鲂五群体间的扩增结果一致, 各扩增片段经同源重排后的长度 (不包括插入/缺失) 分别为: 控制区 937 bp; 细胞色素 *b* 基因 1 140 bp; 16S rRNA 基因片段 564 bp; CO II 基因片段 642 bp (图 1~4)。本实验所测定的基因序列经分区同质性检测, 结果为 $P>0.05$, 表明各基因片段可以合并, 因此本实验依次将控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因片段和 CO II 基因片段合并为一条总长度为 3 283 bp (不包括插入/缺失) 的片段, 以用于群体遗传多样性分析。

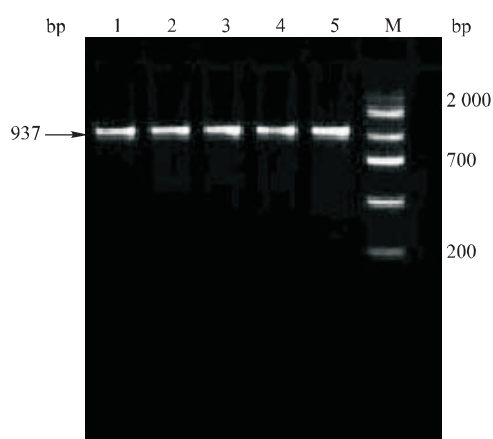
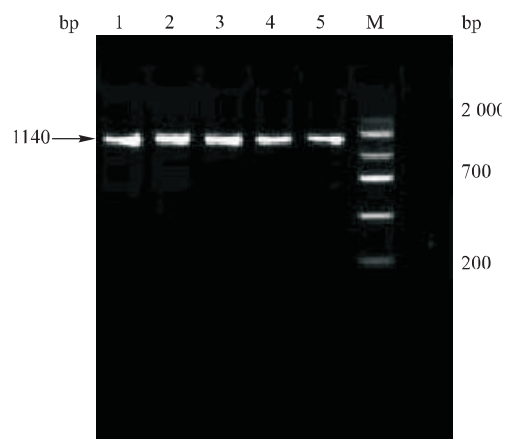


图1 线粒体 DNA 控制区 PCR 扩增结果

1. 同源 4n-F₁; 2. 正交 3n; 3. 反交 3n; 4. 异源 3n; 5. 2n;

M. Marker: 200, 400, 700, 1 000, 1 500, 2 000 bp.

Fig.1 PCR amplification of the mitochondrial DNA control region

1. Auto-4n-F₁; 2. Positive 3n hybrid; 3. Negative 3n hybrid; 4. Allo-3n; 5. 2n; M. Marker: 200, 400, 700, 1 000, 1 500, 2 000 bp.图2 线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因 PCR 扩增结果1. 同源 4n-F₁; 2. 正交 3n; 3. 反交 3n; 4. 异源 3n; 5. 2n;

M. Marker: 200, 400, 700, 1 000, 1 500, 2 000bp.

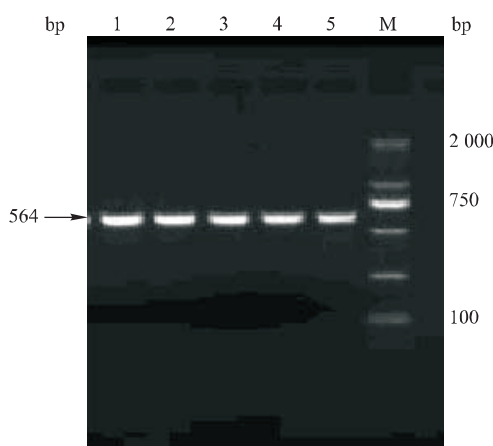
Fig.2 PCR amplification of the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene1. Auto-4n-F₁; 2. Positive 3n hybrid; 3. Negative 3n hybrid; 4. Allo-3n; 5. 2n; M. Marker: 200, 400, 700, 1 000, 1 500, 2 000 bp.

图3 线粒体 DNA 16SrRNA 基因片段 PCR 扩增结果

1. 同源 4n-F₁; 2. 正交 3n; 3. 反交 3n; 4. 异源 3n; 5. 2n;

M. Marker: 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp.

Fig.3 PCR amplification of the mitochondrial DNA 16SrRNA gene fragment

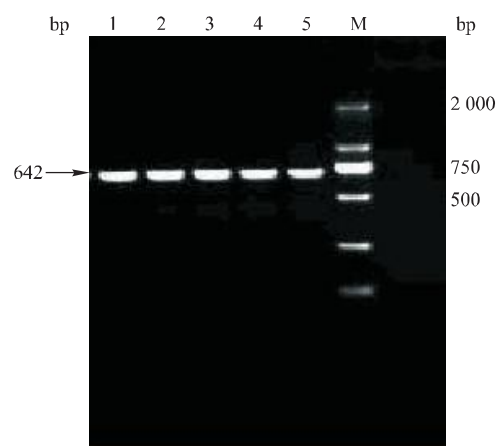
1. Auto-4n-F₁; 2. Positive 3n hybrid; 3. Negative 3n hybrid; 4. Allo-3n; 5. 2n; M. Marker: 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp.

图4 线粒体 DNA CO II 基因片段 PCR 扩增结果

1. 同源 4n-F₁; 2. 正交 3n; 3. 反交 3n; 4. 异源 3n; 5. 2n;

M. Marker: 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp.

Fig.4 PCR amplification of the mitochondrial DNA CO II gene fragment

1. Auto-4n-F₁; 2. Positive 3n hybrid; 3. Negative 3n hybrid; 4. Allo-3n; 5. 2n; M. Marker: 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp.

2.2 团头鲂线粒体DNA碱基组成

A、T、C、G 4 种碱基的平均含量分别为 30.71%、27.18%、25.45% 和 16.66%。A、T、C 的平均含量较接近, A 的平均含量最高 (30.71%), 而 G 的平均含量最低 (16.66%)。另外, A+T 的平均含量 (57.89%) 明显高于 G+C 的平均含量 (42.11%), 这与其他鱼类线粒体 DNA 基因片段的 A+T 含量比较接近^[24], 也符合脊椎动物线粒体 DNA 基因片段碱基组成的特点^[25]。

2.3 5个不同倍性团头鲂群体的遗传结构

2.3.1 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 的单倍型多样性 5 个不同倍性团头鲂群体的单倍型多样性见表 2。在 5 个群体中共检测到 55 种单倍型 (Haplotype), 未发现群体间有任何共享单倍型, 其中 2n 和同源 4n-F₁ 群体的 12 个个体各有 11 种单倍型, 正交 3n、反交 3n 以及异源 3n 群体每 1 个个体即为 1 种单倍型。5 个群体线粒体 DNA 的单倍型多样性在 0.984 8~1.000 0 之间, 这说明 5 个不同倍性团头鲂群体内单倍型类型丰富。

表 2 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 单倍型多样性

Tab. 2 Haplotype diversity (H) of mtDNA in five populations of *Megalobrama amblycephala* with different ploidy levels

项 目 Item	2n	正交 3n Positive 3n hybrid	反交 3n Negative 3n hybrid	异源 3n Allo-3n	同源 4n-F ₁ Auto-4n-F ₁
样本数 Sample size	12	12	12	9	12
单倍型数 Number of haplotypes	11	12	12	9	11
单倍型多样性 ($H, \bar{X} \pm SE$) Haplotype diversity	0.984 8± 0.040 3	1.000 0± 0.034 0	1.000 0± 0.034 0	1.000 0± 0.052 4	0.984 8± 0.040 3

2.3.2 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 的核苷酸多样性 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 的核苷酸多样性结果如表 3 所示。5 个群体内的核苷酸多样性指数 (π) 在 0.248 3%~0.786 6% 之间, 平均核苷酸差异数 (K) 在 8.000~24.273 之间。

在 5 个群体间, π 、 K 这 2 个遗传多样性参数的变化趋势一致, 从大到小顺序依次为: 反交 3n、异源 3n、正交 3n、同源 4n-F₁、2n。Tajima's D 中性检验均不显著 ($P>0.10$ 或 $0.05<P<0.10$), 表明碱基代换速度符合中性突变。

表 3 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 的核苷酸多样性指数 (π) 和平均核苷酸差异数 (K)

Tab. 3 Nucleotide diversity (π) and average number of nucleotide differences (K) of mitochondrial DNA in five populations of *Megalobrama amblycephala* with different ploidy levels

项 目 Item	2n	正交 3n Positive 3n hybrid	反交 3n Negative 3n hybrid	异源 3n Allo-3n	同源 4n-F ₁ Auto-4n-F ₁
核苷酸多样性指数 [$\pi, (\bar{X} \pm SE)\%$] Nucleotide diversity	0.248 3± 0.139 6	0.687 3± 0.367 0*	0.786 6± 0.418 4*	0.715 5± 0.394 9*	0.495 6± 0.267 7*
平均核苷酸差异数 (K) Average number of nucleotide differences (K)	8.000	20.909*	24.273*	22.833*	16.061*
Tajima's D	-1.655 74 (0.05< P <0.10)	-0.512 54 (P >0.10)	-1.311 91 (P >0.10)	-1.103 50 (P >0.10)	-0.754 82 (P >0.10)

注: * 与 2n 组相比差异显著 ($P<0.05$)。
Note: * Significant difference compared with 2n ($P<0.05$)。

反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的核苷酸多样性指数 (π) 以及平均核苷酸差异数 (K) 均显著 ($P<0.05$) 大于 2n 群体, 表明反交 3n、异源

3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的遗传多样性水平显著高于 2n 群体。

2.3.3 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 核

核苷酸序列间的遗传距离 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 核苷酸序列间平均遗传距离在 0.002 4~0.007 5 之间 (表 4), 由大到小依次为: 反交 3n、异源 3n、正交 3n、同源 4n-F₁、2n, 其中, 反交 3n、异源 3n、正交 3n、同源 4n-F₁ 群体内核苷酸序列间的平均遗传距离分别为 0.007 5、0.007 0、0.006 4 和 0.004 9, 显著大于 2n 群体 (0.002 4) ($P<0.05$)。表明反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的遗传多样性水平显著高于 2n 群体, 这与前面核苷酸多样性指数 (π) 以及平均核苷酸差异数 (K) 的分析结果一致。

表 4 5 个不同倍性团头鲂群体内线粒体 DNA 核苷酸序列间的平均遗传距离
Tab. 4 Average genetic distances of nucleotide sequences of mitochondrial DNA within five populations of *Megalobrama amblycephala* with different ploidy levels

群体 Population	核苷酸序列间的平均遗传距离 Average genetic distance of nucleotide sequences
2n	0.002 4±0.000 4
正交 3n Positive 3n hybrid	0.006 4±0.000 9*
反交 3n Negative 3n hybrid	0.007 5±0.000 8*
异源 3n Allo-3n	0.007 0±0.000 7*
同源 4n-F ₁ Auto-4n-F ₁	0.004 9±0.000 6*

注: * 与 2n 组相比差异显著 ($P<0.05$)。
Note: * Significant difference compared with 2n ($P<0.05$).

2.3.4 5 个不同倍性团头鲂群体间线粒体 DNA 核苷酸序列的遗传距离 5 个不同倍性团头鲂群体间的平均遗传距离在 0.003 9~0.010 6 之间 (表 5), 异源 3n 群体与正交 3n 群体之间的遗传距离最大 (0.010 6), 同源 4n-F₁ 群体与 2n 群体之间的遗传距离最小 (0.003 9)。

表 5 5 个不同倍性团头鲂群体间线粒体 DNA 核苷酸序列的平均遗传距离
Tab. 5 Average genetic distances from mitochondrial DNA nucleotide sequences among five populations of *Megalobrama amblycephala* with different ploidy levels

群体 Population	2n	正交 3n Positive 3n hybrid	反交 3n Negative 3n hybrid	异源 3n Allo-3n	同源 4n-F ₁ Auto-4n-F ₁
2n	—	0.009 7±0.001 3	0.005 5±0.000 7	0.004 8±0.000 6	0.003 9±0.000 5
正交 3n Positive 3n hybrid		—	0.009 7±0.001 2	0.010 6±0.001 2	0.009 6±0.001 2
反交 3n Negative 3n hybrid			—	0.006 9±0.000 7	0.006 5±0.000 8
异源 3n Allo-3n				—	0.006 0±0.000 7
同源 4n-F ₁ Auto-4n-F ₁					—

3 讨论

用 1 段较短的 DNA 序列的变化代表整个生物基因组 DNA 序列的变化是一种抽样方法,可能会带来偏差。因此,在无背景资料的情况下,为了获得较为客观的结果,往往需要更多的 DNA 位点来提供更多的信息以减少偏差。在进行群体与进化分子遗传学研究时,都要求较长的 DNA 序列或多个不同的片段序列,以期研究结果能比较真实地反映生物类群的遗传结构和进化历史。例如, Wiley 等^[26]用 12S rRNA 和 16S rRNA 序列对月鱼目(Lampridiformes)鱼类系统发育关系的研究证实,月鱼目为一单系类群,其结果还表明两个 DNA 片段的合并分析比单个片段的分析更有说服力。

本研究从线粒体控制区、细胞色素 *b* 基因、16S rRNA 基因片段及 CO II 基因片段联合的 3 283 bp 片段出发,获得了 5 个不同倍性团头鲂群体内的平均遗传距离 (0.002 4~0.007 5)、核苷酸多样性指数 (π , 0.248 3%~0.786 6%)、单倍型多样性 (H , 0.984 8~1.000 0) 及平均核苷酸差异数 (K , 8.000~24.273), 除单倍型多样性 (H) 外, 以上所有遗传多样性参数在群体间的变化趋势一致, 从大到小依次为: 反交 3n、异源 3n、正交 3n、同源 4n-F₁、2n, 而且, 反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的平均遗传距离、核苷酸多样性指数 (π) 以及平均核苷酸差异数 (K) 均显著大于 2n 群体 ($P<0.05$), 表明反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的遗传多样性水平显著地高于 2n 群体, 这与邹曙明^[27]对团头鲂核基因组的 RAPD 和微卫星标记研究得出的结果相似。由于本研究所用的是线粒体 DNA 标记, 在倍间杂交和传代过程中遵从母系遗传, 一般不发生重组, 上述结果的产生, 可能与“浦江 1 号”群体 (2n) 经过近 10 代选育后 (未发表数据) 群体遗传多样性水平有所降低有关, 也可能与取样的随机误差有关。而 mtDNA 为母系遗传, 原始构建种群的大小对后代种群的遗传多样性有很大影响^[28]。反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体之间遗传多样性水平的递减关系, 可能与其原始构建种群的母本来源和数量的不同有关, 反交 3n 和异源 3n 的母本都为二倍体团头鲂 (“浦江 1 号”) 雌鱼 (2n ♀), 它们的种群规模比较大, 而正交 3n 和同源 4n-F₁ 的母本都为团头鲂同源四倍体雌鱼, 他们的奠基群体很小, 邹曙明^[27]的研究结果显示, 2000 年存

活下来的诱导产生的 35 尾人工同源四倍体雌鱼中, 能正常性成熟且用于人工繁殖的仅 22 尾。由此可见, 母本来源及数量的差异, 可能是造成反交 3n 和异源 3n 群体的遗传多样性水平高于正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体的主要原因。反交 3n 的父本为四倍体团头鲂雄鱼, 异源 3n 的父本为异源 4n 雄鱼 (团头鲂 ♀ × 三角鲂 ♂), 邹曙明^[27]指出, 反交 3n 的父本团头鲂同源 4n 雄鱼中能正常性成熟的有 60 尾, 异源 3n 的父本异源 4n 雄鱼中能正常性成熟的仅 10 尾, 若按一般的雌雄比例进行配组, 则用于生产反交 3n 的二倍体团头鲂雌鱼数量应明显大于用于生产异源 3n 的雌鱼数量, 这可能是反交 3n 群体的遗传多样性高于异源 3n 群体的原因所在。至于正交 3n 群体的遗传多样性高于同源 4n-F₁ 群体, 可能是由人工繁殖时用于生产正交 3n 的团头鲂同源四倍体雌鱼数多于用于四倍体自繁的雌鱼数造成的。

尽管本研究取材有限, 但结果已经能够说明不同倍性团头鲂 5 个群体内存在遗传差异, 尤其是团头鲂多倍体群体 (反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n-F₁ 群体) 的遗传多样性水平较高, 这为团头鲂四倍体基因库的繁殖、保护和种群复壮提供了一些有价值的信息, 也为不育团头鲂的研制、推广以及遗传改良提供了参考资料。

致谢: 在实验和数据处理过程中得到王成辉副教授的协助, 谨表谢忱。

参考文献:

- [1] 李思发, 蔡完其. 团头鲂双向选育效应研究 [J]. 水产学报, 2000, 24 (3): 201-205.
- [2] Li S F, Cai W Q. Genetic improvement of the herbivorous blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. NAGA, 2003, 26 (1): 20-23.
- [3] Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. Aquaculture, 2004, 238: 155-164.
- [4] Li S F, Zou S M, Cai W Q, et al. Production of interplod triploids by 4n × 2n blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) and their first performance data [J]. Aquaculture, 2006, 37 (4): 374-379.
- [5] 唐首杰, 李思发. 不同倍性团头鲂群体遗传变异的初步分析 [J]. 上海水产大学学报, 2007, 16 (2): 97-102.
- [6] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes

- (Teleostei: Perciformes: *Gobioidae*) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 26(3): 354–368.
- [7] Grunwald C, Stabile J, Waldman J R, et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(10): 1 885–1 898.
- [8] Jose A, Carmona J D, Ignacio D. Congruence between allozyme and cytochrome *b* gene sequence data in assessing genetic differentiation within the Iberian endemic *Chondrostoma lemmingii* (Pisces: Cyprinidae) [J]. *Heredity*, 2000, 84: 721–732.
- [9] 郭新红. 不同倍性鱼类 mtDNA 及三倍体湘云鲫 Sox 基因研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2004: 163–181.
- [10] 郭新红, 刘少军, 颜金鹏, 等. 异源四倍体鲫鲤、三倍体湘云鲫和它们父母本线粒体 DNA 12S rRNA 基因遗传变异的分析 [J]. *遗传*, 2004, 26(6): 875–880.
- [11] Goudie C, Simco B, Davis K, et al. Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation [J]. *Aquaculture*, 1995, 133: 185–198.
- [12] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构和进化: 以鳊鲃鱼类为例 [J]. *自然科学进展*, 2002, 12(3): 266–270.
- [14] Xiao W, Zhang Y, Liu H. Molecular systematics of *Xenocyprinae* (Teleostei: cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 18: 163–173.
- [15] Hillis D M, Moritz C, Bable B. *Molecular Systematics* edition [M]. 2nd ed Sunderland: Sinauer, 1996.
- [16] Wang C H, Li S F. Genetic variability and relationships in mitochondrial DNA COII gene sequence of red common carps in China [J]. *Acta Gen Sin*, 2004, 31(11): 1 226–1 231.
- [17] Altschul S F, Thomas L M, Alejandro A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25: 3 389–3 402.
- [18] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [M]. *Nucl Acid Symp Ser*, 1998, 41: 95–98.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4 673–4 680.
- [20] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4.0b10 [Z]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- [21] Farris J S, Källersjö M, Kluge A G, et al. Testing significance of incongruence [J]. *Cladistics*, 1995, 10: 315–319.
- [22] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47–50.
- [23] Kumar S, Tamura K, Nei M, MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings [J]. *Bioinformatics*, 2004, 5: 150–163.
- [24] 王成辉. 中国红鲤遗传多样性研究 [D]. 上海: 上海水产大学. 2002: 61–72.
- [25] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [M]. Hochachka P W and Mommsen T P. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier Science Publishers, 1993, 2: 1–38.
- [26] Wiley E O, Johnson G D, Dimmick W W. The phylogenetic relationships of lampridiform fishes (Teleostei: acanthomorpha), based on a total-evidence analysis of morphological and molecular data [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, 10: 417–425.
- [27] 邹曙明. 团头鲂人工同源和异源四倍体的繁育群体建立及其不同倍性后代的生物学特征分析 [D]. 上海: 上海水产大学, 2004: 28–39, 57–79.
- [28] Ward R D, Grewe P. Appraisal of molecular genetic technique in fisheries [J]. *Rev Fish Biol Fish*, 1994, 4: 300–325.

Analysis of mitochondrial DNA in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) populations with different ploidy levels

TANG Shou-jie, LI Si-fa, CAI Wan-qi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Combined nucleotide sequence of four gene fragments of mitochondrial DNA (mtDNA), which were control region, cytochrome *b* gene, 16S rRNA gene and CO II gene, was analyzed for five populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) with different ploidy levels, which were Auto-4n-F₁, positive 3n hybrid, negative 3n hybrid, allo-3n and 2n, to detect their genetic variations. The lengths of mitochondrial DNA control region, cytochrome *b* gene, 16S rRNA gene and CO II gene were 937 bp, 1 140 bp, 564 bp and 642 bp, respectively. These four gene fragments were combined to form a 3 283 bp long gene fragment. The average contents of nucleotides T, C, A, G were 27.18%, 25.45%, 30.71% and 16.66%, respectively in the 3 283 bp long sequence. 55 haplotypes were defined in the 57 individual, without haplotype shared among populations. The diversity of haplotypes were 0.984 8~1.000 0, indicating the abundance of haplotypes within different populations. The nucleotide differences and the nucleotide diversity within each population were 8.000~24.273, and 0.248 3 %~0.786 6%, respectively. Genetic distance between populations were 0.003 9~0.010 6. The above results indicated that genetic diversity in five populations of blunt snout bream with different ploidy levels was very high. There was the same trend in the change of nucleotide diversity (π), average number of nucleotide differences (K) and average genetic distances of nucleotide sequences among five populations, that is to say, from high to low is: negative 3n hybrid, allo-3n, positive 3n hybrid, auto-4n-F₁, 2n. What's more, nucleotide diversity (π), average number of nucleotide differences (K) and average genetic distances of nucleotide sequences of negative 3n hybrid, allo-3n, positive 3n hybrid and auto-4n-F₁ were significantly higher than those of 2n ($P<0.05$). It could be concluded that the genetic diversity within negative 3n hybrid, allo-3n, positive 3n hybrid and auto-4n-F₁ populations were significantly higher than that of 2n population. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 222-229]

Key words: blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*); ploidy; mitochondrial DNA; genetic variation

Corresponding author: LI Si-fa. Tel: 021-65710333; E-mail: sfli@shfu.edu.cn