

长江流域铜鱼和圆口铜鱼的遗传多样性

袁希平^{1,2}, 严莉², 徐树英², 汪登强², 张燕², 陈大庆^{2,3}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北荆州 434000; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要: 利用线粒体 DNA 控制区序列多态性分析了长江流域铜鱼 (*Coreius heterodon*) 和圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*) 各 4 个群体的遗传结构; 同时利用 9 对自行开发的多态性微卫星标记分析圆口铜鱼 4 个群体的遗传结构。结果显示, 铜鱼线粒体 DNA (mtDNA) D-loop 序列共检出 22 个多态位点, 28 种单倍型, 平均单倍型多样性指数 (h) 和核苷酸多样性指数 (π) 分别为 0.849 和 0.002 57。圆口铜鱼线粒体 DNA (mtDNA) D-loop 序列共检出 18 个多态位点, 28 种单倍型, 平均单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数分别为 0.902 和 0.004 24。分子变异分析 (AMOVA) 结果提示, 铜鱼和圆口铜鱼分别有 98.80% 和 99.17% 的遗传变异发生于群体内部, 表明铜鱼和圆口铜鱼未出现种群分化。选用的 9 个微卫星标记在圆口铜鱼群体中共检测到 48 个等位基因; 群体平均观测杂合度在 0.631~0.753 之间; 平均期望杂合度为 0.598~0.728; 平均多态信息含量为 0.548~0.670。结果表明, 长江流域铜鱼遗传多样性较低, 长江上游圆口铜鱼遗传多样性较高, 且均未出现种群遗传分化。圆口铜鱼 SSR 固定指数为 0.121 58, 高于 D-loop 固定指数, 显示 SSR 标记对圆口铜鱼群体间遗传差异的检测更为灵敏。[中国水产科学, 2008, 15(3): 377~385]

关键词: 铜鱼; 圆口铜鱼; 线粒体 D-loop; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q959.468

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)03-0377-09

铜鱼 (*Coreius heterodon*) 和圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*), 隶属于鲤科、鲴亚科、铜鱼属, 是长江特有鱼种。铜鱼在长江干流与支流均有分布, 以中下游居多; 圆口铜鱼主要分布在长江上游, 在中游的宜昌至荆州江段也可发现, 但数量较少。这两种鱼均是长江重要的经济鱼类。近年来, 由于环境污染、三峡水利枢纽及过度捕捞的影响, 铜鱼和圆口铜鱼资源呈下降趋势^[1-4]。因此, 充分了解铜鱼和圆口铜鱼的群体遗传多样性, 对于资源的保护和开发具有重要意义。

线粒体 DNA (mtDNA) 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的特征^[5], 已成为研究动物起源进化、群体遗传、系统发育等的重要标记。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^[6-8]。

微卫星是以 1~6 个核苷酸为基本重复单位组成的核苷酸重复序列。微卫星分布于真核生物整个基因组, 具有呈共显性遗传、容易检测、重复性高等优点^[9-10], 已广泛应用于动植物遗传多样性、品系鉴定、连锁图谱构建、辅助遗传育种等研究领域。近年来, 微卫星也越来越多地被应用于水产动物的遗传多样性研究中^[11-14]。有关铜鱼和圆口铜鱼的研究大多集中在生理生化方面, 涉及遗传背景的研究很少^[15-18]。本研究采用线粒体 DNA 控制区序列多态性以及微卫星标记两种技术研究铜鱼和圆口铜鱼的群体遗传结构和分化, 以期为该种类的资源保护与合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

铜鱼样品与圆口铜鱼样品均系向当地渔民直接购买。样品来源分别为: 铜鱼, 于 2004 年 10~11 月

收稿日期: 2007-08-10; 修订日期: 2008-01-01.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30490234); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD03B09); 科技部社会公益项目 (2005DIB3J025).

作者简介: 袁希平 (1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子生态学研究. E-mail: kerryuan@163.com

通讯作者: 陈大庆. Tel: 0716-8130008; E-mail: chdq@yfi.ac.cn

采自长江干流重庆万州江段 (WT)23 尾、湖北沙市江段 (ST)30 尾、江西湖口江段 (HT) 24 尾、江苏常熟江段 (CT)25 尾,共计 102 尾;圆口铜鱼,于 2005 年 5 月份采自长江干流四川宜宾江段 (YB)31 尾、重庆巴南江段 (BN)33 尾、涪陵江段 (FL)34 尾和忠县江段 (ZX)34 尾,共计 132 尾。每个样本剪少量新鲜尾鳍条放入 95% 乙醇保存,带回实验室备用。

1.2 总DNA的提取

取少量尾鳍条,用灭菌双蒸水洗去酒精后,再加入 500 μL 的 HOM Buffer(80 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris,0.5% SDS,pH 8.0) 和 10~15 μL 的蛋白酶 K(20 mg/mL) 于 55 ℃ 的恒温箱中温育 3 h 以上,加入 4.5 mol/L NaCl 500 μL 和 300 μL 的氯仿,混合摇匀 20 min,13 000 r/min 常温离心 10 min,取上清液加入 595 μL 异丙醇混匀 20 min,离心去上清液,加入 0.5 mL 75% 冰乙醇洗涤,13 000 r/min 常温离心 20 min,去上清液,自然干燥后加入 50 μL 的去离子水溶解,于 -20 ℃ 保存备用。

1.3 铜鱼和圆口铜鱼mtDNA D-loop 序列多态性分析

扩增 D-loop 基因片段的引物序列^[19] 如下:
tRNA^{pro}: 5' -CTCCCAAAGCTAGGATTCTAA
ACTAAACTA-3'
tRNA^{phe}: 5' -GGTTCATCTTAACATCTTCAG

TGTTATGCT-3'

PCR 的反应总体积为 50 μL,其中含 10× Buffer (Mg²⁺)5 μL、Taq 酶 (5 U /μL)0.4 μL、dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μL、引物各 2 μL、模板 45~60 ng、灭菌双蒸馏水补至 50 μL。反应程序:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 40 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 6 min。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,对扩增效果好的 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,用 DNA 回收试剂盒 (Omega) 回收目的 DNA 片段。回收产物送往上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 圆口铜鱼微卫星分析

用 9 对自行开发具有多态性的微卫星引物 (表 1) 对长江 4 个江段的圆口铜鱼群体共 132 个个体 DNA 进行扩增,PCR 反应总体积为 25 μL,其中,10× Buffer (含 Mg²⁺)2.5 μL、Taq 酶 0.5 U、dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μL、引物各 0.8 μL、模板 45~60 ng、灭菌双蒸馏水补至 25 μL。反应程序:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 40 s,45~56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 6 min。扩增产物经 0.8% 的琼脂糖电泳及紫外凝胶成像系统检测。鉴定有扩增产物后,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,银染,并在凝胶成像系统下观察结果与拍照。

表 1 圆口铜鱼微卫星标记及其引物
Tab.1 Microsatellite markers and their primers in *C.guichenoti*

微卫星标记 Microsatellite marker	引物序列 (5' → 3') primer sequence (5' → 3')	核心序列 SSR motif	退火温度 /℃ T _m	等位基因数 Nos. of alleles
YT03	F: AGTCACCACCTGCTCTGT R: GTATGCGGCAAACCTTCTT	(GT) ₇	45	4
YT05	F: AGAAAGAGATGCACTGATAA R: GGAATGTGATGCCAACTAAC	(GT) ₁₀	49	5
YT07	F: CGCTGGAGAGTAAGAGGC R: GGAAATTCCCACCGTGAT	(AC) ₁₅	49	8
YT10	F: GGACGAAACATGGACATGA R: ATTTGGCTCTCCGTACAG	(CT) ₁₅	52	6
YT17	F: ACCCACAAAGACACTGACCAAG R: GATCGCCAGGCAGAGCTAACAA	(CT) ₆ (AC) ₅	56	3
YT18	F: CAGGATTCCAACAGGTTTCGG R: TGACATTGTTGATCTCGTGGTC	(AC) ₇ (CCCACA) ₂	56	4
YT19	F: CCAATCAATATGTAGAACAAGG R: CAACATCGGAAAGTAAGAAGT	(TG) ₂₁ ... (AG) ₂₁	53	8
YT21	F: AGGATTTCGGATATTGCCATT R: AGAGTCAAAGCTACCATCATAAG T	(AC) ₁₀ (GA) ₁₃	53	7
YT22	F: CGACTAATACATCTGAGCCCTCC R: ATTGCTGTTCCCTCGATCCAC	(AC) ₇	56	3

注: F, 正向引物; R, 反向引物。
Note: F, forward; R, reverse primer sequence.

1.5 数据统计与分析

1.5.1 铜鱼和圆口铜鱼 mtDNA D-loop 分析 使用 Lasergene v6 软件包结合手工对测序结果进行序列校对。然后,用 ClustalX^[20]对序列进行对位排列。用 DNASP 4.0 分析软件^[21]计算多态位点、单倍型数目、单倍型多样性指数 (*h*) 和核苷酸多样性指数 (π)。用 Mega3.1 计算机软件^[22]统计碱基组成,并构建单倍型 NJ 分子系统树。使用分子变异分析 (AMOVA)^[23]方法分析种群遗传结构。

1.5.2 圆口铜鱼微卫星分析 微卫星标记基因呈共显性,直接从表型获知其基因型,从而可以计算各微卫星位点的等位基因的数量和大小。利用 PopGen32^[24]计算以下参数:等位基因个数 (N_e)、等位基因频率、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、多态信息含量 (PIC)。

2 结果与分析

2.1 基于 mtDNA D-Loop的铜鱼遗传多样性分析

2.1.1 mtDNA D-Loop 序列及其变异 对铜鱼 760 bp 的 D-Loop 片段进行分析,A、T、C、G 4 种碱基的含量分别为 33.0%、30.6%、21.4%、14.9%。很明显,A+T 的含量 (63.6%) 明显高于 G+C 的含量 (36.3%)。共检测到 22 个突变位点 (图 1),其中 11 次转换、5 次颠换,6 个位点发生插入或缺失。

2.1.2 群体遗传多样性分析 用 DNASP 4.0 软件进行核苷酸多样性分析,有关参数如表 2 所示。从多态位点数和核苷酸多样性指数看,遗传多样性以常熟铜鱼群体最高,万州铜鱼群体最低,其顺序由高到低依次为:常熟群体、沙市群体、湖口群体和万州群体;从单倍型多样性指数看,沙市铜鱼群体最高,万州铜鱼群体最低,其顺序由高到低依次为:沙市群体、常熟群体、湖口群体和万州群体。

表 2 铜鱼不同群体内 mtDNA D-loop 遗传多样性分析
Tab.2 Genetic diversity by mtDNA D-loop among 4 populations of *C. heterodon*

指标 Index	WT	ST	HT	CT	合计 Total
多态性位点数 (<i>S</i>)	7	9	9	8	22
单倍型多样性指数 (<i>h</i>)	0.717	0.838	0.866	0.841	0.849
核苷酸多样性指数 (<i>p</i>)	0.0018	0.0032	0.0027	0.0032	0.0026

注: WT- 万州群体; ST- 沙市群体; HT- 湖口群体; CT- 常熟群体。
Note: WT-Wanzhou population; ST-Shashi population; HT-Hukou population; CT-Changshu population.

2.1.3 群体间的遗传分化 用 DNASP 4.0 软件分析长江铜鱼遗传距离,结果如表 3。由该表可以看出沙市和常熟群体间的遗传距离最大,为 0.002 67;湖口和万州群体最小,为 0.001 59;各群体之间的遗传

距离在 0.001 59~0.002 67 之间。由表 3 可以看出,铜鱼群体间的 mtDNA D-Loop 区的核苷酸变异水平不大,未产生群体分化。

表 3 铜鱼 4 个群体间的遗传距离
Tab.3 Genetic distance among 4 populations of *C. heterodon*

群体 Population	WT	ST	HT	CT
WT	***			
ST	0.001 73	***		
HT	0.001 59	0.002 03	***	
CT	0.002 31	0.002 67	0.002 54	***

注: WT- 万州群体; ST- 沙市群体; HT- 湖口群体; CT- 常熟群体。
Note: WT Wanzhou population; ST Shashi population; HT Hukou population; CT Changshu population.

Yan 等^[19]根据 D-Loop 基因序列差异,采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建分子系统树,反映了铜鱼各单倍型间的亲缘关系。从分子系统树可以看出,28 个单倍型聚合成 3 个分支:clade1 (Hap1~Hap13)、

clade 2 (Hap14~Hap20) 和 clade 3 (Hap21~Hap28)。单倍型各分支没有明显的遗传分化,bootstrap 支持率也较低,不同群体的单倍型在系统树上相互交叉,这表明铜鱼没有明显群体分化。

单倍型 Haplotype	铜鱼变异位点 Variable sites in <i>Coreius heterodon</i>	圆口铜鱼变异位点 Variable sites in <i>Coreius guichenoti</i>
	47111122444445555556	45111111233334558
	0011240701447803699990	752268991667789125
	57530652697047901232	4905056696726559
Hap_1	GAACGCATCTGTTTAT—C	ATTTTGTGATCACCTAAG
Hap_2	. G. G. —.	. . C. T. . . .
Hap_3	. G. . . . C. G. —.	. . C.
Hap_4	. G. G. —.	. . C.
Hap_5	. G. —.	. . C. CG. .
Hap_6	. G. . . T. . . . C. . . . —.	. . C. . . . A. . . . G. .
Hap_7	AG. . T. C. . . . —.	. . C. C. . . . G. .
Hap_8	AG. C. . . . —.	. CC. C. . . . G. .
Hap_9	. G. C. . . . —.	. . C. C. . . T. G. .
Hap_10	. G. C. . . TA. .	. . C. T. . .
Hap_11	AG. T. . . —.	. CC. G. . .
Hap_12	. G. TATA. .	. CC. G. . .
Hap_13	. G. . . . G. C. . . TA. .	. G. C. G. . .
Hap_14	. G. . . . G. C. . . —.	. G. C.
Hap_15	. G. C. . . —.	. G. C. CA. G. .
Hap_16	. G. A. C. . —.	. G. C. C. . . G. T. . . . G. .
Hap_17	. G. . A. C. . . G. —.	. G. C. C. . . G. G. .
Hap_18	. G. C. . . G. —.	. G. C. CA. T. . G. .
Hap_19	. G. T. C. . . —.	. GCC. CA. TC. G. .
Hap_20	. G. C. . . TA. .	. G. CCCA. T. . G. .
Hap_21	. G. A. . . . —.	. . CCCA. T. . G. .
Hap_22	. G. . . T. . . AAA. —.	. G. C. CAC. T. . G. .
Hap_23	. G. T. A. —.	. G. C. CAC. T. . G. .
Hap_24	. G. A. . . . TA. .	. G. C. CA. A. . . C. T. . G. .
Hap_25	. G. . A. —.	. G. C. CA. A. . . C. T. . G. .
Hap_26	. GG. A. . . . A. . . . TA. .	. . C. CAC. . . T. . T. . G. .
Hap_27	. GG. A. . . . A. . . . TATA. .	. . C. CAC. . . T. . T. . A. .
Hap_28	. G. . A. . . . A. . . . TATA. .	. . C. CAC. . . T. . T. . G. .

图1 长江铜鱼和圆口铜鱼 mtDNA 控制区的变异位点

Fig.1 Variable sites of mtDNA control region of *Coreius heterodon* and *Coreius guichenoti* in Yangtze River

2.2 基于mtDNA D-Loop的圆口铜鱼遗传多样性分析

2.2.1 mtDNA D-Loop 序列及其变异 对圆口铜鱼 923 bp 的 D-Loop 片段进行分析, T、C、A、G 4 种碱基的平均含量分别为 30.8%、21.5%、34.0%、13.7%, 且 A + T 的含量 (64.8%) 明显高于 G+C 的含量 (35.2%)。共检测到 28 个单倍型, 18 个突变位点 (图 1), 其中 2 个缺失 / 插入的位点, 仅有

一个颠换位点, 其余均为转换。

2.2.2 群体遗传多样性分析 在 4 个群体样本中, 核苷酸多样性指数和单倍型多样性指数分别为 0.004 2 和 0.090。核苷酸多样性指数最高的是忠县群体 (0.004 5), 最低的是宜宾群体 (0.003 8); 单倍型多样性指数最高的是涪陵群体 (0.922), 最低的是巴南群体 (0.867), 详见表 4。

表 4 圆口铜鱼群体 mtDNA D-loop 遗传多样性分析

Tab.4 Genetic diversity by mtDNA D-loop among different populations of *C. guichenoti*

指标 Index	YB	BN	FL	ZX	合计 Total
多态位点点数 (S)	13	14	16	16	18
单倍型多样性指数 (h)	0.901	0.867	0.922	0.911	0.902
核苷酸多样性指数 (p)	0.0083	0.0041	0.0044	0.0045	0.0042

注: YB 宜宾群体; BN 巴南群体; FL 涪陵群体; ZX 忠县群体。

Note: YB Yibin population; BN Banan population; FL Fuling population; ZX Zhongxian population.

2.2.3 群体遗传结构 4 个群体间的遗传距离列于表 5, 从该表中可以看出宜宾群体和巴南群体间的遗传距离最大 (0.006 56); 而涪陵群体和忠县群体间的遗传距离最小 (0.005 29)。圆口铜鱼单倍型的邻接法 (Neighbor-Joining) 分子系统树及在各个群体的分布见图 2。图 2 显示, 单倍型 Hap14 拥有的频次最高, 为 29 (21.97%); 其次是单倍型 Hap18, 为 20 (15.15%)。频次最高的前 5 个单倍型 (Hap4、Hap14、Hap18、Hap19、Hap21) 在 4 个群体中均有分布。AMOVA 分析显示固定值 (F_{st}) 为 0.008 3, 表明圆口铜鱼遗传变异有 99.17% 来自群体内部, 只有 0.83% 的遗传变异来自群体之间, 各群体之间的遗传变异不明显, 即长江上游圆口铜鱼未出现种群分化。

表 5 圆口铜鱼 4 个群体间 mtDNA D-loop 序列的遗传距离

Tab.5 Genetic distance among 4 populations of *C. guichenoti* by mtDNA D-loop sequence

群体 Population	YB	BN	FL	ZX
YB	***			
BN	0.006 56	***		
FL	0.005 78	0.006 10	***	
ZX	0.005 66	0.005 44	0.005 29	***

注: YB- 宜宾群体; BN- 巴南群体; FL- 涪陵群体; ZX- 忠县群体。

Note: YB-Yibin population; BN-Banan population; FL-Fuling population; ZX-Zhongxian population.

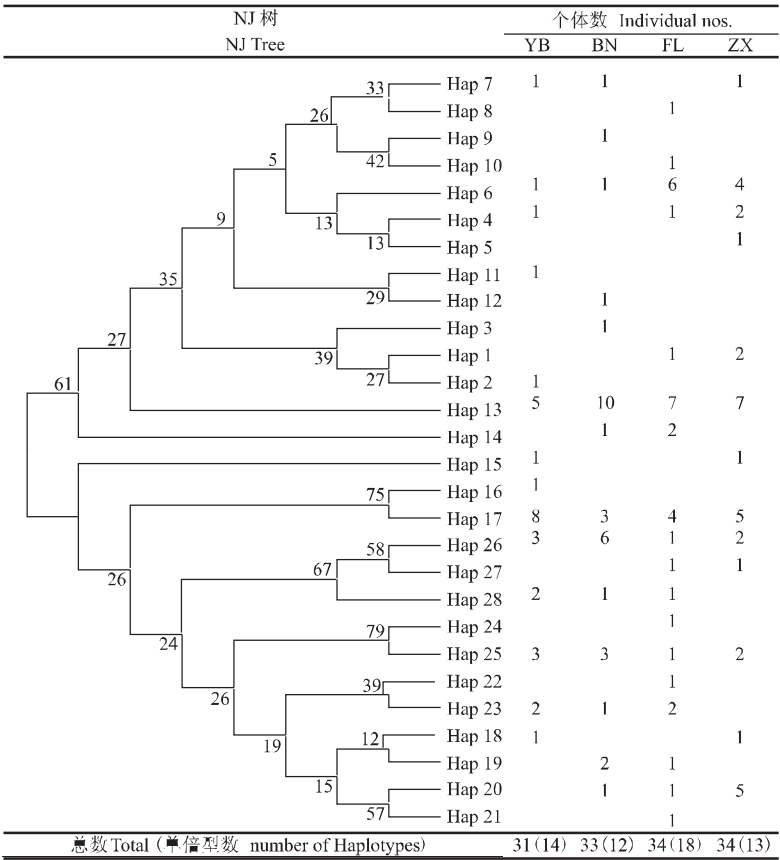


图 2 圆口铜鱼 4 个自然群体 (节点处数字表示 bootstrap 支持率) 28 种单倍型的分子系统树和其在各群体内的分布

BN: 巴南群体; FL: 涪陵群体; YB: 宜宾群体; ZX: 忠县群体.

Fig. 2 Molecular phylogenetic tree constructed on 28 haplotypes of *C. guichenoti* and their distribution in the four natural populations (numbers at nodes indicate the percent of bootstrap support after 1 000 replicates)

BN: Banan population; FL: Fuling population; YB: Yibin population; ZX: Zhongxian population.

2.3 圆口铜鱼微卫星分析

2.3.1 遗传多样性 本实验对各个微卫星位点上的等位基因个数、期望杂合度、观测杂合度和多态信息含量进行了统计分析 (表 6)。在 4 个江段圆口铜鱼群体 9 个微卫星座位上共发现了 48 个等位基因, 其中在 YT07 和 YT19 微卫星座位上检测的等位基因最多, 为 8 个; 在 YT17 和 YT22 微卫星座位上检测到的等位基因最少, 只有 3 个。平均每

个座位上的等位基因为 5.3 个。平均观测杂合度在 0.631~0.753 之间, 最高的是宜宾群体 (0.753), 最低的是涪陵群体 (0.631); 平均期望杂合度为 0.598~0.728, 最高的是宜宾群体 (0.728), 最低的是巴南群体 (0.598), 各群体的平均杂合度均较高。平均多态信息含量为 0.548~0.670, 最高的是宜宾群体 (0.670), 最低的是巴南群体 (0.548)。

表 6 圆口铜鱼微卫星位点的平均观测杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 、多态性息含量 PIC				
Tab.6 Average heterozygosity and PIC of 9 microsatellite loci in 4 <i>C. guichenoti</i> populations				
指标 Index	YB	BN	FL	ZX
H_o	0.753	0.649	0.631	0.651
H_e	0.728	0.598	0.629	0.673
PIC	0.670	0.548	0.568	0.610

注: BN- 巴南群体; FL- 涪陵群体; YB- 宜宾群体; ZX- 忠县群体 .

Note: BN-Banan population; FL-Fuling population; YB-Yibin population; ZX-Zhongxian population.

2.3.2 圆口铜鱼群体间遗传相似性和遗传距离

根据 4 江段的圆口铜鱼群体在 9 个微卫星座位的基因频率,运用 PopGen32 软件计算得到的遗传相似系数和 Nei 氏遗传距离(表 7)。由表 7 可知,

忠县江段和涪陵江段的遗传距离最小,为 0.144 9,两者的遗传相似性系数最大,为 0.865 1;而宜宾江段和巴南江段的遗传距离最大,为 0.290 0,两者的遗传相似性系数为 0.748 3。

表 7 圆口铜鱼 4 个群体微卫星遗传相似系数和 Nei 氏遗传距离

Tab.7 Genetic similarity and Nei's genetic distance among 4 *C.guichenoti* populations by 9 microsatellite loci

群体 Population	YB	BN	FL	ZX
YB		0.7483	0.8224	0.8244
BN	0.2900		0.8508	0.7996
FL	0.1956	0.1616		0.8651
ZX	0.1931	0.2236	0.1449	

注:对角线以上是遗传相似性,对角线以下是遗传距离;BN-巴南群体;FL-涪陵群体;YB-宜宾群体;ZX:忠县群体。

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal); BN-Banan population; FL-Fuling population; YB-Yibin population; ZX-Zhongxian population.

2.3.3 圆口铜鱼微卫星多态性分析和 mtDNA D-loop 序列分析比较 经 AMOVA 方法处理后,得到群体间以及群体内的遗传变异情况及固定指数(表 8)。经比较发现,来自群体内的遗传变异均大于来自群体间的遗传变异;变异组成也同样是群体内大

于群体间;SSR 固定指数为 0.121 58, D-loop 固定指数为 0.008 31。这一结果表明,圆口铜鱼核内基因组存在中度遗传差异(F_{st} 在 0.05~0.15 之间),核外基因组的遗传差异很小($P<0.05$)。

表 8 圆口铜鱼群体遗传变异组成的 SSR 分析及 mtDNA D-loop 序列分析结果比较
Tab.8 Comparison of genetic variance in *C. heterodon* using SSR and mtDNA D-loop

标记 Marker	群体间变异组成 Variance components among populations	群体内变异组成 Variance components within populations	群体间变异所占比例/% Percentage of variation among populations	群体内变异所占比例/% Percentage of variation within populations	固定指数 F_{st}
SSR	5.52536	9.91943	12.16	87.84	0.12158
D-loop	0.01639	1.95529	0.83	99.17	0.00831

3 讨论

3.1 长江铜鱼和圆口铜鱼的遗传多样性

mtDNA 中, D-Loop 是唯一的非编码区,进化速率是编码序列的 2~5 倍^[25],因而常被用于群体遗传学研究。在 102 尾铜鱼样本中,760 bp 的 mtDNA D-Loop 仅检测到 22 个突变位点、28 种单倍型。从突变位点数和单倍型出现比例来看,长江铜鱼不仅比其他鲤科鱼类,如胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)^[26]、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[27]等的遗传多样性低,而且比目前公认的遗传多样性较低的鲟形目鱼类^[28]还低。铜鱼单倍型多样性指数(h)和核苷酸多样性指数(p)均小于圆口铜鱼(表 2、表 4),表明铜鱼遗传多样性小于圆口铜鱼。杂合度(H)可以反映群体在各个位点的遗传变异水平,是度量群体

遗传变异的一个有效参数^[28]。圆口铜鱼平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.753 及 0.728,高于长江水系的铜鱼、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)以及黑龙江流域的大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[30-32],这说明圆口铜鱼遗传多样性较高。

3.2 铜鱼和圆口铜鱼的种群分化

铜鱼 4 个群体有 28 种单倍型,其中 3 种单倍型为 3 个群体所共有,出现几率达 44%;有 7 种单倍型为 2 个群体共有,另外有 18 种单倍型为某群体独有,这 12 种单倍型的遗传距离在 0~0.007 98 之间;4 个群体间的遗传距离都在 0~0.003 之间,且都在单倍型间遗传距离范围内,没有明显差异。从单倍型系统树上看,不同群体的单倍型在系统树上相互交叉,未出现明显种群分离;D-loop 固定值(F_{st})为 0.012,表明铜鱼遗传变异有 98.8%来自群体内部,只有 1.2%的遗传变异来自群体之间,各群

体之间的遗传变异不明显^[33-34]。说明长江铜鱼的遗传结构没有明显分化,整个长江铜鱼均属于单一种群。

圆口铜鱼4个群体中有28种单倍型,其中5种单倍型为4个群体所共有,并且这5种单倍型的出现频率较大(54.5%);有11种单倍型为2个或3个群体所共有,另外有12种单倍型为某个群体独有;从遗传距离看,群体间的遗传距离都较大($D>0.005$),说明圆口铜鱼遗传多样性较为丰富;从单倍型系统树上看,4个群体的单倍型在系统树上呈现相互交叉情况;D-loop固定指数(F_{st})为0.0083,表明圆口铜鱼遗传变异有99.17%来自群体内部,只有0.83%的遗传变异来自群体之间,各群体之间的遗传变异不明显^[33-34]。说明长江上游圆口铜鱼的遗传结构没有明显分化,属于单一种群。SSR固定指数为0.12158高于D-loop固定指数,这表明SSR比D-loop更适用于圆口铜鱼群体水平遗传多样性分析。

长江干流铜鱼和圆口铜鱼群体遗传结构之所以没有明显的遗传分化,可能是由于铜鱼和圆口铜鱼具有集群洄游繁殖的习性,导致上、下游铜鱼和圆口铜鱼各群体间基因交流频繁,也可能是所采用的遗传标记变异不够大,不足以检测到它们的分化。

3.3 遗传资料在资源监测与保护中的意义

本研究材料是三峡大坝蓄水前后所取的样本,绝大多数为蓄水前出生的个体,其遗传多样性反映了三峡大坝蓄水前的情况,描述了三峡大坝蓄水前长江铜鱼和圆口铜鱼不同自然群体的遗传多样性特征,填补了历年来铜鱼和圆口铜鱼遗传多样性资料的空白。三峡大坝建成后,库区和坝下水域生态环境将发生根本性的改变^[35],这种改变对包括铜鱼和圆口铜鱼在内的渔业资源带来多大的影响,还有待将来的研究对比证实。本研究为今后长期监测铜鱼和圆口铜鱼资源变动,特别是三峡大坝对渔业资源的影响提供了遗传本底资料和参考,也为制定相关保护措施提供理论依据。

参考文献:

- [1] 陈大庆,刘绍平,段辛斌,等. 长江中上游主要经济鱼类的渔业生物学特征[J]. 水生生物学报,2002,26(6): 618-623.
- [2] 何学福. 铜鱼的生物学研究[J]. 西南师范学院学报,1980,

6(2): 60-76.

- [3] 许蕴珩,邓中舜,余志堂,等. 长江的铜鱼生物学及三峡水利枢纽对铜鱼资源的影响[J]. 水生生物学报,1981,7(3): 271-294.
- [4] 冷永智,何立太,魏清和. 葛洲坝水利枢纽截流后长江上游铜鱼的种群生物学及资源量估算[J]. 淡水渔业,1984,5: 21-25.
- [5] Cano R L, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA[J]. Genetics,1984,106: 479-499.
- [6] Gatt 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 Am Fish Soc,2000,129(6): 1288-1299.
- [7] Zardoya R, Meyer A. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibia: Gymnophiona) [J]. Genetics,2000(2): 765-775.
- [8] Rosel P E, Dizon A E, Haygood M G. Variability of the mitochondrial control in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales [J]. Can J Fish Aquat Sci,1995,52: 1421-1429.
- [9] Maarten J N, Franz J W. Constraints on Allele Size at microsatellite Loci: Implications for Genetic Differentiation [J]. Genetics,1996, (143): 1021-1032.
- [10] Yan J P, Liu S J, Sun Y D, et al. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) $\times$ common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquaculture,2005(243): 49-60.
- [11] Yuea G H, Hoa M Y, Orban L. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp [J]. Aquaculture,2004, (234): 85-98.
- [12] Andrew P M, Amanda T P, Leslie R N. Conservation of a dinucleotide simple sequence repeat locus in sharks [J]. Mol Phylogenet Evol,2002(23): 205-213.
- [13] 耿波,孙效文,梁利群,等. 利用17个微卫星标记分析鳊鱼的遗传多样性[J]. 遗传,2006,28(6): 683-688.
- [14] 梁利群,常玉梅,董崇智. 微卫星DNA标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J]. 水产学报,2004,28(3): 241-244.
- [15] 葛清秀,王志坚,张昊星. 长江铜鱼和圆口铜鱼肝胰腺的比较研究[J]. 泉州师范学院学报: 自然科学版,2001,19(6): 69-74.
- [16] 郑曙明,吴青. 铜鱼和圆口铜鱼耗养率的研究[J]. 四川畜牧

- 兽医学院学报,1998,12(3 4): 6 8.
- [17] 郑曙明. 铜鱼和圆口铜鱼肌肉氨基酸的初步研究 [J]. 四川畜牧兽医学院学报.1998,12(3 4): 23 25.
- [18] 余先觉,周敏,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体 [M]. 北京: 科学出版社,1989.
- [19] Yan L, Wang D Q, Fang Y L, et al. Genetic diversity in the bronze gudgeon, *Coreius heterodon*, from the Yangtze River system based on mtDNA sequences of the control region. *Environ Biol Fish*, 0.1007/s10.1007/s 10.1007/s 10641-007-9248-z.
- [20] 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 Res*, 1997, 2: 4 876-4 882.
- [21] Rozas J, Rozas R. DNASP Version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis[J]. *Bioinformatics*, 1999, 15: 174 175.
- [22] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, et al. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis version 2.0[J]. The Pennsylvania University, University Park, PA, 2001.
- [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: 479-491.
- [24] Yeh F C, Yang R C. POPGENE VERSION 1.32: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis quick user guide[P]. University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International Forestry Research, 1999.
- [25] Aquadro C F, Greenberg B D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals[J]. *Genetics*, 1983, 103: 287 312.
- [26] 孙玉华,王伟,刘思阳,等. 中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析 [J]. 遗传学报,2002,29(9): 787 790.
- [27] 陈大庆,张春霖,鲁成,等. 青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性 [J]. 中国水产科学,2006,1(5): 800-806.
- [28] 张四明,邓怀,汪登强,等. 7 种鲟形目鱼类亲缘关系的随即扩增多态性 DNA 研究 [J]. 自然科学进展,1999,9: 20-26.
- [29] Dimitry A C, Bart H, Filip A M V. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [J]. *Aquaculture*, 2005, 255: 1-29.
- [30] Liao X L, Zhou B, Yu X, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, brass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker) [J]. *Molecular Ecology Note*, 2006(6): 393 395.
- [31] 廖小林,俞小牧,谭德清,等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. 水生生物学报,2005,29(2): 113 119.
- [32] 陈金平,董崇智,孙大江,等. 微卫星标记对黑龙江流域大马哈鱼遗传多样性的研究 [J]. 水生生物学报,2004,6(28): 607-612.
- [33] Weir B S. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data[M]. MA: Sinauer Assoc Inc, Sunderland, 1996.
- [34] Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating[J]. *Evolution*, 1965, 19: 395-420.
- [35] 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L. 长江中下游鳊鱼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.

Genetic diversity of bronze gudgeon (*Coreius heterodon*) and largemouth bronze gudgeon (*C. guichenoti*) in Yangtze River Basin

YUAN Xi-ping^{1,2}, YAN Li², XU Shu-ying², WANG Deng-qiang², ZHANG Yan², CHEN Da-qing^{2,3}

(1. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The bronze gudgeon (*Coreius heterodon*) and largemouth bronze gudgeon (*C. guichenoti*) are economically important species in Yangtze River. The stocks declined drastically in recent years due to dam construction, over-fishing, and water pollution. Little is known about their population genetic structure, which has become an obstacle to further research on the protection, management, rational exploitation and sustainable utilization of these fish. In this study, mitochondrial DNA D-Loop sequences were used to investigate the genetic diversity of 102 bronze gudgeon individuals, collected from the upper (Wanzhou, 23 individuals), middle (Shanghai, 30 individuals; Hukou, 24 individuals), and lower (Changshu, 25 individuals) reaches of the Yangtze River, and the genetic diversity of 132 largemouth bronze gudgeon individuals, collected from the upper reaches (Yibin, 31 individuals; Banan, 33 individuals; Fuling, 34 individuals; Zhongxian, 34 individuals) of Yangtze River. Additionally, 9 polymorphic simple sequence repeats (SSR) loci were used to assess the genetic diversity of bronze gudgeon from four sites in the upper reaches of Yangtze River. The results showed that among the aligned mtDNA D-Loop sequences of 760 basepair in bronze gudgeon, 22 variable sites, including 11 transition substitution sites, 5 transversion sites and 6 insertion sites among all individuals, recovered 28 haplotypes, and the haplotype diversity (p) and nucleotide diversity (h) were 0.849 and 0.002 6, respectively. Among the aligned mtDNA D-Loop sequences of 923 basepair in largemouth bronze gudgeon, 18 variable sites, including 15 transition substitution sites, 1 transversion sites and 2 insertion sites among all individuals, recovered 28 haplotypes, and the haplotype diversity (p) and nucleotide diversity (h) were 0.902 and 0.004 2, respectively. The haplotype diversity (p) and the nucleotide diversity (h) were lower in bronze gudgeon than in largemouth bronze gudgeon, which indicated that the genetic diversity of bronze gudgeon was lower than that of largemouth bronze gudgeon. Analysis of molecular variance (AMOVA) suggested that the genetic divergences, occurring within the populations in bronze gudgeon and within the populations in largemouth bronze gudgeon, were 98.8% and 99.17%, respectively. Nine polymorphic simple sequence repeats (SSR) loci identified a total of 48 alleles in largemouth bronze gudgeon, with observed heterozygosity (H_o) value ranging from 0.631 to 0.753, expected heterozygosity (H_e) value ranging from 0.598 to 0.728 and polymorphism information content (PIC) value ranging from 0.548 to 0.670. The results suggest that while the genetic diversity of the bronze gudgeon in Yangtze River is low, the genetic diversity of largemouth bronze gudgeon in the upper reaches of Yangtze River is under in good condition. Very little genetic differentiation occurred among the populations of bronze gudgeon in Yangtze River and among the populations of largemouth bronze gudgeon in the upper reaches of Yangtze River. The F_{st} of SSR (0.121 58) was higher than that of D-loop in *Coreius guichenoti*, demonstrating that SSR was more suitable for analysis of genetic polymorphism in *Coreius guichenoti*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 377–385]

Key words: bronze gudgeon; largemouth bronze gudgeon; mtDNA D-Loop; SSR; genetic diversity

Corresponding author: CHEN Da-qing. E-mail: chdq@yfi.ac.cn