

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00500

根据 mtDNA 控制区序列分析野生唇鲮的种群遗传结构

佟广香, 匡友谊, 尹家胜, 耿龙武, 徐伟

中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070

摘要: 为了掌握不同地理种群唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 的遗传多样性和遗传结构, 探讨其亲缘地理演化过程, 研究了乌苏里江、长江、黑龙江、鸭绿江和牡丹江 5 大水系, 8 个地理群体 ($n=42$) 的 mtDNA 控制区 404 bp 片段的变异, 该片段共有 26 个变异位点, 变异率为 6.43%, 平均核苷酸多样性为 0.011 5。42 尾样本共检测到 18 个单倍型, 这 8 个地理群体是以 HT1 和 HT2 单倍型为中心向外辐射演化的。AMOVA 分析结果表明, 群体内变异为 59.29%, 同一水系群体间变异为 23.50%, 不同水系群体间变异为 17.20%, 以上变异均达到显著水平 ($P<0.05$), 群体间配对 F_{ST} 分析结果表明, 同一水系内有些群体间差异也达到了显著水平。聚类分析发现, 最大简约法 (MP) 和最大似然法 (ML) 结果基本一致, 嘉荫群体 (HRJY) 和四川群体 (YRSC) 绝大部分个体被聚在一支, 鸭绿江群体 (YRLJ) 聚在一支, 这与单倍型网络的分析结果一致, 以上结果表明唇鲮的遗传多样较为丰富, 黑龙江流域的唇鲮保持了祖先单倍型, 其他地理群体为黑龙江流域内群体向不同方向演化的结果, 并且部分地理群体已经形成了特有的单倍型。

关键词: 唇鲮 (*Hemibarbus labeo*); 线粒体控制区; 单倍型; 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-500-08

唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 属鲤科, 鲃亚科, 鲮属, 是中小型经济鱼类, 其肉质鲜嫩, 具有较高的营养价值。20 世纪 50-60 年代在中国各大水系均有分布, 但东北地区较南方多^[1]。近 10 年来, 由于过度捕捞、环境的恶化以及自身的生物学特性等因素, 其分布区域和数量急剧下降, 目前除在黑龙江和乌苏里江还有一定的产量外, 其他水域已较难见到^[2]。为了保护和开发这一经济动物, 已经成功地对其进行了全人工繁殖和养殖^[3], 但有关唇鲮的研究在国内外依然较少, 主要集中在地域分布、生物学和形态学的描述^[4-5], 群体分子生物学方面的研究更少^[6-7], 相关线粒体方面仅有吕耀平等^[8]对瓯江地区花鲮和唇鲮 COII 的研究, 并结合 NCBI 已知的其他鲮属鱼类的 COII 序列, 构建了 5 种鲮属鱼类的系统进化树, 目前还没有不同水系唇鲮群体的 mtDNA 研究的报道。

动物 mtDNA 结构简单, 遵循母系遗传, 进化速率是核 DNA 的 5-10 倍, 是系统遗传学理想的分子标记。mtDNA 控制区由于不编码任何基因, 已被广泛应用于种群遗传学研究中^[9-10], 并且由它所构建的系统发育树节点支持率较高, 所以在研究近缘物种和种内群体间的遗传变异时, 比利用保守基因序列能够得到更近期、更丰富的信息^[11-12]。本研究针对来自 5 个水系的 8 个唇鲮地理群体进行了 mtDNA 控制区序列测定和分析, 比较了不同水系唇鲮群体的遗传多样性和遗传结构, 并探讨了其亲缘地理演化过程。

1 材料与方法

1.1 样品采集及 DNA 提取

本研究在黑龙江流域的黑龙江、乌苏里江和牡丹江水系采集了 6 个地理群体, 共 32 个个体, 在长江水系涪江成都段和鸭绿江临江江段采集了

收稿日期: 2010-01-12; 修订日期: 2010-04-20.

基金项目: 黑龙江省科委重点研究项目 (GC05B509); 黑龙江水产研究所基本科研业务费专项资助课题 (2007HSYZX-YZ-02).

作者简介: 佟广香, (1978-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产动物遗传育种研究. Email: tong2200@163.com

通信作者: 徐伟 (1970-), 男, 研究员, 专业方向鱼类遗传育种. E-mail: xwsc23@tom.com

2 个地理群体 10 个样品进行序列分析(表 1), 来自同一水系的群体设定为一组。其中牡丹江和鸭绿江样品为鳍条, 保存于 75%乙醇中, 其他群体采

肌肉冷冻保存, 样品采用标准的酚-氯仿法提取 DNA, 具体参见参考文献[13], DNA 提取后, 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 唇鲮样品采集的群体代号、数量及采集地
Tab.1 Population codes, locality, sample size of *Hemibarbus labeo*

水系 river system	群体 geographic population	样本数目 sample size	采集地 locality
乌苏里江水系 Wusuli River	WRHT	6	乌苏里江虎头江段 Hutou region of Wusuli River
	WRHQ	6	乌苏里江海青江段 Haiqing region of Wusuli River
	WRZJ	6	乌苏里江抓吉江段 Zhuaji region of Wusuli River
长江水系 Yangtze Rive	YRSC	5	长江水系涪江成都江段 Chengdu region of Yangtze River
黑龙江水系 Heilongjiang River	HRXK	6	黑龙江逊克江段 Xunke region of Heilongjiang River
	HRJY	6	黑龙江嘉荫江段 Jiayin region of Heilongjiang River
鸭绿江水系 Yalu River	YRLJ	5	鸭绿江临江江段 Linjiang region of Yalu River
牡丹江水系 Mudan River	MRJL	2	牡丹江镜泊湖 Jingpo Lake region of Mudan River

1.2 PCR 扩增及序列测定

建立 25 μ LPCR 反应体系, 其中包括 5 U/ μ L *Taq* 酶(MBI)0.2 μ L\1.5 mmol/L 的 Mg^{2+} 、2 m mol/L 的 dNTP 和 10 \times PCR 混合 Buffer 2.5 μ L, 10 pmol/L 的上下游引物各 1 μ L。引物序列如下, DLP480: 5'-TGCATATAAAAGAATGCCGCGCAT G-3'; DLT: 5'-TCACCCCTGGCTCCCAAAGCCA G-3'^[14]。进行 PCR 扩增, 扩增程序为: 94 预变性 5 min; 94 50 s, 55 1 min, 72 1 min, 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序, 测序获得的测序峰用 Base-Call 算法进行碱基判读, GAP4 进行序列拼接^[15], 去除 5'和 3'端平均置信度低于 15 的低分值碱基。

1.3 数据分析

所获的序列用 ClustalW 软件进行多重比对^[16], BioEdit 软件检查比对结果并手动校正^[17]。对校正后的序列用 PAUP4.10b 软件分析配对序列间分歧度(pairwise sequence divergence)、碱基的转换和颠换率及构建系统发生树^[18], 同时使用 ModelTest3.0 软件确定核苷酸最佳进化模型^[19], 并在此基础上用最大简约法(MP)和最大似然率(ML)构建系统发生树(bootstrap 值为 1 000)。采用 Mega4.0 软件^[20]的 Kimura 双参数模型计算群体

内、群体间及单倍型间的分歧距离(D_a)。用 TCS1.13 软件^[21]构建单倍型的无根进化网络(95%的简约判断标准, gap 作为位点缺失), 用于计算各单倍型的亲缘关系。用 Arlequin3.1 软件计算单倍型多态性和核苷酸多态性^[22], 进行 AVOMA 分析以确定群体间遗传分化系数 F_{ST} 和配对群体间 F_{ST} (pairwise population F_{ST})。

2 结果与分析

2.1 D-loop 序列分歧

42 个个体成功扩增出 D-loop 序列, 序列长度为 404 bp, 经多重序列比对分析表明, 共有 26 个变异位点, 其中含有简约信息位点 22 个, 变异率为 6.43%。平均碱基含量分别为: T, 35.8%; C, 14.2%; A, 32.2%; G, 17.8%, (A+T)含量明显高于 (C+G)含量。在 8 个群体中共发现 18 个单倍型(表 2), 其中 MRJL 群体只有 1 个单倍型, WRHQ、WRZJ、HRJY 群体单倍型最多, 为 6 个。所有群体间平均序列分歧距离(D_a)为 0.019 5, 群体内单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数、序列分歧距离和群体间序列分歧距离见表 3。ModelTest 分析结果表明, 最佳进化模型为 HKY + I, 在此模型下, 各碱基的分布频率分别为: A, 31.53%; C, 14.12%; G, 17.77%; T, 36.58%。碱基的转换率 T_i

表 2 单倍型在唇鲮各群体中的分布
Tab.2 Haplotypes and their frequencies for D-loop sequence across all eight *Hemibarbus labeo* populations

n = 42

群体 population	单倍型 haplotype																	
	WR						YR				HR				YR			
	HT1	HT2	HQ2	HQ4	HQ5	ZJ4	SC1	SC3	SC4	SC6	XK6	JY1	JY2	JY4	JY6	YL1	YL2	YL3
WRHT	2	4																
WRHQ	3		1	1	1													
WRZJ	2	1			1	1					1							
YRSC							1	1	1	1			1					
HRXK	1	4									1							
HRJY												3	1	1				
YRLJ												1				1	2	2
MRJL	2																	

注: 群体代号参见表 1

Note: Code for each populations is shown in table 1.

表 3 唇鲮群体多态性及序列分歧距离
Tab. 3 Diversity and sequence divergence(D_n) among *Hemibarbus labeo* populations

群体 population	单倍型多态性 haplotype diversity, <i>h</i>	核苷酸多态性 nucleotide diversity, π	群体 population								
			WRHT	WRHQ	WRZJ	YRSC	HRXK	HRJY	YRLJ	MRJL	
WRHT	0.5333	0.0119	0.0122								
WRHQ	0.8000	0.0106	0.0160	0.0108							
WRZJ	0.9333	0.0144	0.0139	0.0118	0.0147						
YRSC	1.0000	0.0255	0.0267	0.0307	0.0288	0.0252					
HRXK	0.6000	0.0083	0.0093	0.0190	0.0155	0.0264	0.0084				
HRJY	0.8000	0.0155	0.0255	0.0305	0.0279	0.0183	0.0250	0.0159			
YRLJ	0.8000	0.0060	0.0106	0.0211	0.0175	0.0281	0.0082	0.0256	0.0060		
MRJL	0.0000	0.0000	0.0152	0.0059	0.0089	0.0295	0.0194	0.0293	0.0218	0.0000	
平均值 mean	0.6833	0.0115									

注: 粗体数字表示群体内的序列分歧距离; 群体代号参见表 1.

Note: Bold figures indicate average sequence divergence within populations. Code for each populations is shown in table 1.

和颠换率 T_v 的比值为 4.500 5。

2.2 单倍型网络

8个群体中共有18个单倍型(图1, 表2), 是以HT1和HT2单倍型向外辐射演化的, 其中YRLJ群体具有3个特有单倍型, HRJY和YRSC群体分别具有3个和4个群体特有单倍型, HT1单倍型为其他5个群体的共享单倍型(表2)。

单倍型无根网络分析结果见图 1, 频率最高的单倍型用方框表示, 其他用椭圆表示, 方框及椭圆的大小表示分布频率。HT1 和 HT2 为频率较高的单倍型, 包含了黑龙江、乌苏里江和牡丹江

的绝大部分个体, 以 HT1 和 HT2 向外辐射。

2.3 群体间的遗传分化

AMOVA 分析结果见表 4, 从所得数据可知, 组间变异占总变异的 17.20%, 组内群体间变异占总变异的 23.50%, 群体内变异占总变异的 59.29%, 群体内、组内群体间及组间差异均显著($P < 0.05$)。

群体间遗传分化系数(F_{ST})分析结果见表 5。由表 5 可知, 乌苏里江江段 3 个地理群体中 WRHT 与 WRHQ 群体差异显著, 而 WRHQ 和 WRZJ 群体间无遗传分化(F_{ST} 为负), 黑龙江江段 HRXK 和 HRJY 群体间差异显著, MRJL 群体除与 YRSC 和

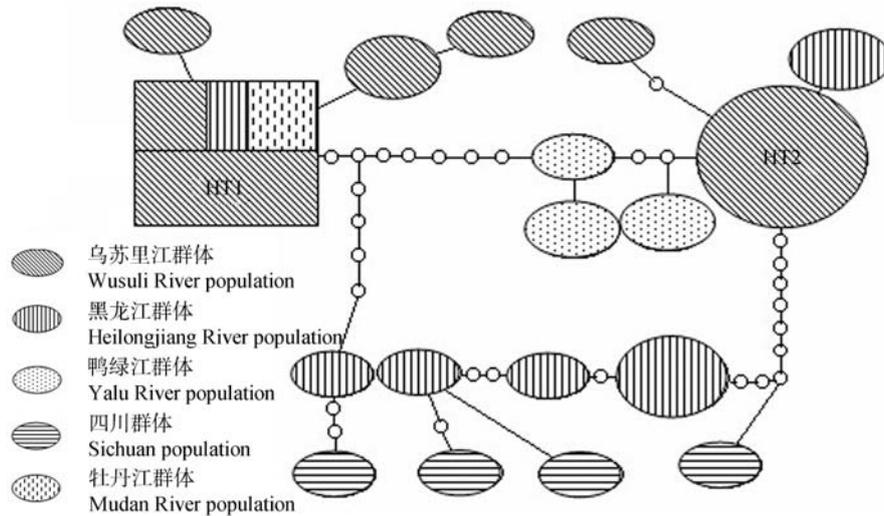


图 1 唇鲮群体的 D-loop 单倍型无根网络

单倍型用方框和椭圆表示, 方框和椭圆的面积表示单倍型的分布频率, 空心圆表示单倍型之间的变异步骤。

Fig. 1 Parsimony networks of D-loop observed in *Hemibarbus labeo*

Haplotypes are indicated by box and ellipse, and their square represent distribution frequencies of haplotypes. The small cycles represent putative steps between haplotypes.

表 4 唇鲮群体的 D-loop 基因序列的分子方差分析

Tab.4 AMOVA of D-loop sequence for eight *Hemibarbus labeo* populations

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差分量 variance component	总变异百分比/% percentage of variation
组间 among groups	4	50.628	0.739	17.20*
组内群体间 among populations within groups	3	25.806	1.009	23.50*
群体内 within populations	34	86.567	2.546	59.29*

注: *表示差异达到显著性水平($P < 0.05$).

Note: * indicated significant difference($P < 0.05$).

表 5 基于 D-loop 序列分析的唇鲮群体间遗传分化系数(F_{ST})

Tab. 5 F_{ST} of combined data from D-loop sequence analysis among *Hemibarbus labeo* populations

群体 population	WRHT	WRHQ	WRZJ	YRSC	HRXK	HRJY	YRLJ	MRJL
WRHT	0.000							
WRHQ	0.284*	0.000						
WRZJ	0.036	-0.079	0.000					
YRSC	0.312*	0.423*	0.314*	0.000				
HRXK	-0.109	0.493*	0.253	0.384*	0.000			
HRJY	0.450*	0.560*	0.456*	-0.111	0.513*	0.000		
YRLJ	0.294*	0.634*	0.466*	0.464*	0.321*	0.594*	0.000	
MRJL	0.400	-0.215	-0.123	0.368*	0.658	0.578*	0.806	0.000

注: *表示群体间具有显著的遗传分化($P < 0.05$); 群体代号参见表 1.

Note: * indicated significant genetic differentiation between populations($P < 0.05$). Code for each populations is shown in table 1.

HRJY 群体间差异显著外($P < 0.05$), 与其他群体间差异均不显著($P > 0.05$), 而 HRJY 与 YRSC 两群体间无显著遗传分化($P > 0.05$), 但均与其他 6 个群

体间的遗传分化达到显著水平($P < 0.05$).

将 D-loop 序列各单倍型进行聚类分析发现, 最大简约法(MP)和最大似然率法(ML)结果基本

一致(图 2、图 3), 各分支上的单倍型相同, 仅分支节点略有差异。HRJY 群体和 YRSC 群体绝大部分个体被聚在一支, YRLJ 群体分布在一支, 和单倍型网络的结果一致。

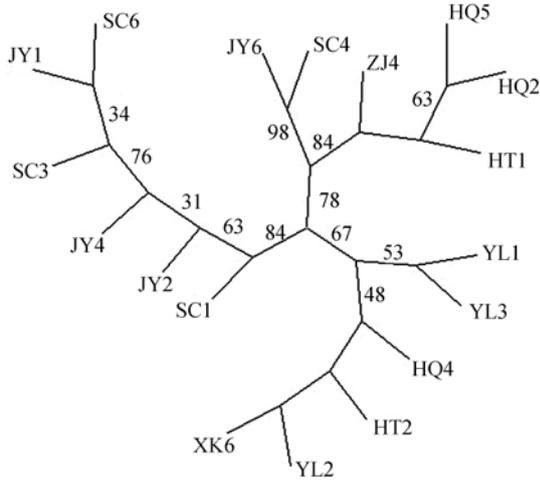


图 2 基于唇鲮D-loop 序列构建的最大简约聚类树
节点数字表示 Bootstrap 支持率(%)。

Fig. 2 MP tree based on combined data from D-loop sequences
Numbers at nodes represent percentage of 1 000 bootstrap

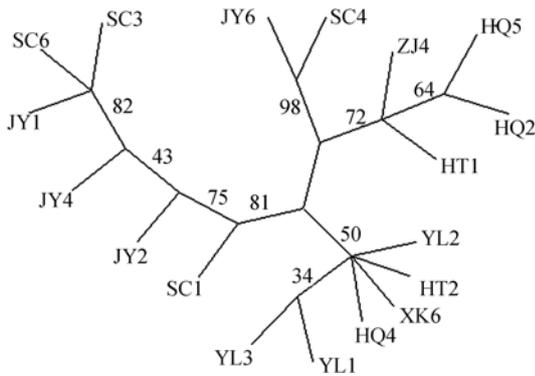


图 3 基于唇鲮D-loop 序列构建的最大似然聚类树
节点数字表示 Bootstrap 支持率(%)。

Fig. 3 ML tree based on combined data from D-loop sequences
Numbers at nodes represent percentage of 1 000 bootstrap.

3 讨论

3.1 唇鲮的 D-loop 序列特征

从鱼类线粒体 D-loop 序列分析研究的报道可知, 蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)mtDNA D-loop 基因的 AT 含量为 68.64%、梭鱼(*Mugil so-iuy*)D-loop 基因的 AT 含量为 65%、中华鲟(*Acipe-*

nser sinensis)D-loop 基因的 AT 含量为 58.1%^[14,23], 本研究中 AT 含量为 68%, CG 含量为 32%, AT 含量均明显大于 GC 含量, 符合其他鱼类 mtDNA D-loop 区域碱基组成的特点。同时用 ModelTest 软件分析表明, 唇鲮最佳进化模型为 HKY + I, 在最佳进化模型下, 碱基的转换率 T_i 和颠换率 T_v 的比值为 4.500 5, 这与线粒体基因组 DNA 进化过程中发生碱基转换的频率远远高于碱基颠换频率的规律一致。随着进化时间增加, 颠换不断积累, 转换和颠换的比值会下降, 一般认为转换颠换比值小于 2.0 时, 此基因序列突变已经达到饱和和状态^[24-26], 受进化噪音的影响可能性较大, 重建系统发生树时如不进行特别加权就会得出错误信息^[27], 且同属间转换高于颠换约 2 倍, 同目不同属及不同目之间碱基替换状况是颠换高于转换近 1 倍。在本研究中转换率 T_i 和颠换率 T_v 的比值为 4.5005, 说明 8 个群体是同属的不同地理群体, 同时表明基因片段序列突变未达到饱和, 野生群体的 D-loop 序列还存在很大的变异空间, 用其构建系统发生树时不需要加权。

3.2 唇鲮遗传多样性及群体间序列分歧距离

近年来, 随着中国经济的快速发展, 许多河流及近海遭受污染, 鱼类面临较大的生存压力, 除种群数量急剧下降外, 物种的遗传多样性降低成为普遍现象。遗传多样性降低会导致物种对环境的适应能力和生存能力降低、物种退化, 极端情况下甚至威胁物种生存^[28-29], 因此遗传多样性成为衡量物种生存能力的一个重要指标。在采用 mtDNA 技术来研究物种多样性时, 核苷酸多样性 (π) 越小表明群体间的多态程度越低^[30]。本研究中, 唇鲮平均核苷酸多样性为 0.011 5, 高于分布于长江流域的鳙 (*Aristichthys nobilis*, 0.008)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*, 0.002)^[30] 和圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*, 0.0042 4)^[31], 也高于同分布在高原地区的云南倒刺鲤 (*Spinibarbus denticulatus yunnanensis*, 0.01 35)、青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii przewalskii*) (0.004 3)^[32], 这表明目前唇鲮野生种群存在着丰富的多样性, 与胡雪松等^[7] 用微卫星及吕耀平等^[8] 用 RAPD 的研究结果一致,

进而可以说明目前野生唇鲮遗传多样性水平并未影响到其生存能力, 资源量减少并不是由遗传多样性水平降低造成的。

群体内和群体间的序列分歧距离及 AMOVA 分析表明, 群体内、组内群体间及组间差异均显著($P < 0.05$); F_{ST} 分析结果表明, 大部分组内群体间差异不显著($P > 0.05$), 仅 WRHQ 和 WRHT、HRXK 和 HRJY 群体间的差异达到显著水平($P < 0.05$)。WRHT、WRHQ 和 WRZJ 群体同属于乌苏里江水系, WRZJ 与 WRHQ 群体间地理距离较近, 二者基本上属于一个地理种群(F_{ST} 为负值), 但随着群体间距离的扩大, 虎头江段的 WRHT 群体已经与 WRHQ 群体间存在明显的遗传分化, 同样 HRXK 和 HRJY 虽同属于黑龙江水系, 遗传差异也达到了显著水平。造成这种现象有 2 个原因: 一是由唇鲮的生活习性造成的, 唇鲮不具有洄游习性, 与洄游鱼类相比, 地理隔离更容易造成其群体间的交流减少, 遗传分化明显; 二是由于环境恶化和人类活动(过度捕捞、修建水库)等造成的栖息地的片段化, 致使各群体在空间上相对隔离, 在个体的迁移能力不变的情况下, 隔离距离越大, 群体间的基因流越小, 从而导致同一水系群体间随着地理距离的加大, 遗传分化增大^[32]。

3.3 唇鲮单倍型网络及群体遗传结构

单倍型网络分析表明, 8 个群体以 HT1 和 HT2 单倍型向四周发散, 说明 HT1 和 HT2 为唇鲮祖先单倍型, 这 2 种单倍型包含了 WRHT、WRHQ、WRZJ、MRJL 和 HRXK 群体中大部分个体, 这些群体均属于黑龙江流域, 进而说明黑龙江流域群体是唇鲮的祖先群体, 其他群体由这些群体迁徙演化而成; 或者是由于地质灾害、人为原因等造成地理隔离, 从而向不同方向演化的结果, 其中 YRSC 群体与黑龙江群体地理距离最远, 演化步骤也最长。从图 1 中可以看出, YRLJ 和 HRJY 群体是 HT2 单倍型向不同方向演化的结果, 而 YRSC 群体则是 HRJY 群体进一步演化的结果, 演化的同时这些群体在自己的区域内形成了特有的单倍型。黑龙江流域一直以来是唇鲮的主要产

区, 20 世纪 50~60 年代唇鲮分布较广, 黑龙江和嫩江上游分布较多; 其次是松花江、乌苏里江、牡丹江、达赉湖和五大连池等水域^[33-34]。根据近几年的资源调查^[33-34], 仅有黑龙江、乌苏里江还能形成产量, 其他几条河流中, 现已很难见到其踪迹, 这主要是由于黑龙江、乌苏里江是中国和俄罗斯的界河, 又地处两国的偏远地区, 居住人口相对较少, 自然水域保护得相对较好, 中国界内黑龙江和乌苏里江虽然都有渔船进行捕捞作业, 但网具和网目都有严格限制, 还制定了严格的休渔期, 这为唇鲮的资源恢复提供了良好的环境。而其他流域内由于产量比较少, 一直没有资源方面的报道。从单倍型网络可以看出, 由于长期的地理隔离, 这些群体已经与祖先群体间产生了差异, 并且进化成自己特有的单倍型, 因此应对其资源量、栖息环境、产卵场等进行全面保护, 防止遗传分化进一步增大。

参考文献:

- [1] 孟庆闻, 缪学祖, 俞泰济, 等. 鱼类学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1989: 233-235.
- [2] 徐伟, 李池陶, 曹顶臣, 等. 乌苏里江唇鲮的鳞片和生长特征[J]. 动物学杂志, 2008, 43(3): 108-112.
- [3] 徐伟, 李池陶, 耿龙武, 等. 乌苏里江唇鲮的全人工繁育[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 550-556.
- [4] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 137-140.
- [5] 乐佩琦. 鲮属鱼类的分类整理[J]. 动物分类学报, 1995, 20(1): 116-123.
- [6] 吕耀平, 胡则辉, 叶丽平. RAPD 标记在唇鲮与花鲮种质鉴定中的应用[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2008, 35(3): 326-329.
- [7] 胡雪松, 石连玉, 李池陶, 等. 黑龙江和乌苏里江唇鲮的微卫星引物筛选及群体遗传结构[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 230-236.
- [8] 吕耀平, 胡则辉, 叶丽平, 等. 甌江流域唇鲮和花鲮线粒体 COII 基因部分序列分析[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2008, 35(5): 580-585.
- [9] Rosel P E, Dizon A E, Haygod M G. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* on interoceanic and regional

- scales[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995, 52: 1421-1429.
- [10] Horai S, Hayasaka K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA[J]. *Am J Hum Genet*, 1990, 46: 828-842.
- [11] 张燕, 张鹤, 何舜平. 中国鳊科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析[J]. *水生生物学报*, 2003, 27(5): 463-467.
- [12] Avise J C. *Phylogeography: The history and formation of species*[M]. London: Harvard University Press, 2000: 9-32.
- [13] 佟广香, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 哲罗鱼基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 181-186.
- [14] 郑冰蓉, 张亚平, 肖衢, 等. 鲤属鱼类 mtDNA 控制区(D-环区)序列的变异性分析[J]. *水产学报*, 2002, 26(4): 289-294.
- [15] Staden R. The staden sequence analysis package[J]. *Mol Biotechnol*, 1996, 5(3): 233-241.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal xwindows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 24: 4876-4882.
- [17] Hall T A. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt [J]. *Nucl Acids Res Symposium Series 1 & 5*, 1999, 41: 95-98.
- [18] Swofford D L. Paup. version 4.0.B10. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods[M]. Sunderland MA: Sinauer Associates, 2002.
- [19] Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817-818.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599.
- [21] Clement M, Posada D, Crandall K A. Tcs: A computer program to estimate gene genealogies [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(10): 1657-1660.
- [22] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evol Bioinform Online*, 2005, 1: 47-50.
- [23] 董金苟, 吴清江. 三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性[J]. *水生生物学报*, 2001, 25(1): 54-60.
- [24] 牛屹东, 李明, 魏辅文, 等. 线粒体 DNA 用作分子标记的可靠性和研究前景[J]. *遗传*, 2001, 23(6): 593-598.
- [25] Hirano M, Shtilbans A, Mayeux R, et al. Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus-embedded mtDNA pseudogenes[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(26): 14894-14899.
- [26] 周继亮, 张亚平, 黄美华, 等. 蝮亚科蛇线粒体 Cyt b 基因序列分析及其系统发育[J]. *动物学报*, 2001, 47 (4): 361-366.
- [27] Knight A, Mindell D P. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic position of *fea's viper*[J]. *Syst Biol*, 1993, 42 (1): 18-31.
- [28] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to conservation genetics*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [29] Vrijienhoek R C. *Genetic diversity and fitness in small populations*[M]//Conservation genetics. Basel: Birkhäuser- Verlag, 1994: 37-53.
- [30] 彭珊, 代应贵. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性[J]. *水产学报*, 2009, 33(2): 196-200.
- [31] 袁希平, 严莉, 徐树英, 等. 长江流域铜鱼和圆口铜鱼的遗传多样性[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 377-385.
- [32] 赵凯, 李军祥, 张亚平, 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.
- [33] 张觉民. *黑龙江省鱼类志*[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 137-140.
- [34] 任慕莲. *黑龙江鱼类*[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1981: 69-72.

Population structure of *Hemibarbus labeo* as inferred from mtDNA control region sequence

TONG Guangxiang, KUANG Youyi, YIN Jiasheng, GENG Longwu, XU wei

Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

Abstract: Genetic diversity and structure were investigated to explore the phylogeography and evolution of *Hemibarbus labeo* from five different river systems, including Wusuli River, Yangtze Rive, Heilongjiang River, Yalu River and Mudan River. The mtDNA control region was used to analyze genetic differentiation of eight geographical populations ($n=42$) in this study. Results showed that 26 variation sites existed in a 404 bp sequence with variation rate of 6.43% and average nucleotide diversity of 0.011 5. The sequence information identified 18 haplotypes in the control region gene. Eight geographical populations were evolved through a mode of center outward radiation based on DWRHT1 and DWRHT2 haplotype. AMOVA analysis showed that the variation rate was 59.29% within populations, 23.50% among populations from the same river system and 17.20% among populations from the different river system. There was significant difference within different populations, among populations from the same river system and populations from different river systems ($P<0.05$). Pairwise F_{ST} of control region sequence analysis among populations showed that there was significant difference among several populations from the same river system. Cluster analysis showed that maximum-parsimony method (MP) and maximum likelihood ratio method (ML) results were basically consistent, which suggested that most individuals from HRJY and YRSC population clustered together and individuals from YRLJ population clustered into a single branch. Meanwhile, cluster analysis results were found to be consistent with haplotype parsimony network analysis. These results suggested abundant genetic diversity existed among *hemibarbus labeo* populations. However, the population size was decreased due to environmental pollution and overexploitation in recent years. In addition, *H. labeo* from Heilongjiang River kept ancestral haplotypes, while *H. labeo* from other river systems had evolved to different directions based on haplotypes from Heilongjiang River and formed their unique haplotypes during the long-term evolution and geographical isolation.

Key words: *Hemibarbus labeo*; mtDNA control region; haplotype; genetic diversity

Corresponding author: XU Wei. E-mail: xwsc23@tom.com