

怒江濒危鱼类缺须盆唇鱼基于线粒体 Cyt *b* 序列的群体遗传结构分析

张东亚^{1,2}, 汪登强^{1,3}, 刘绍平¹, 郭志强¹, 岳兴建⁴, 邓华堂¹, 陈大庆^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 2. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 3. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 4. 西南大学 生命科学学院, 重庆 北碚 400715)

摘要: 测定了怒江缺须盆唇鱼 (*Placocheilus cryptonemus*) 5个群体共138尾个体的线粒体DNA Cyt *b* 基因序列, 以探讨群体遗传结构和遗传多样性。结果显示: 1 140 bp的Cyt *b* 基因共检测到21个变异位点, 从138个样本中得到21个单倍型, 平均单倍型多样性 (h) 为0.826, 核苷酸多样性 (π) 为0.002 15, 遗传多样性水平较低。5个群体中, 泸水群体遗传多样性相对最高, 保山道街群体最低。计算5群体的Kimura 2-parameter 遗传距离, 福贡群体和龙镇桥群体之间的遗传距离最远, 为0.003 46; 泸水群体和保山道街群体之间的遗传距离最近, 为0.000 93。Fu' F_s 中性检验和核苷酸不配对分析暗示了缺须盆唇鱼在历史上可能发生过种群扩张。分子方差分析 (AMOVA) 表明, 5群体间总遗传分化系数 $F_{st}=0.305 1$ ($P<0.05$), 群体间具有较高的遗传分化水平。结果说明, 怒江缺须盆唇鱼遗传多样性较低, 具有较高的遗传分化水平, 这可能是由于该物种自身活动能力差以及中游和下游生境明显差异所致。[中国水产科学, 2009, 16(4): 477-486]

关键词: 怒江; 缺须盆唇鱼; 群体遗传结构; 遗传多样性; 细胞色素 *b* 基因;

中图分类号: Q959.468

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)04-0477-10

怒江位于中国西南地区, 起源于西藏唐古拉山南麓, 流经云南, 进入缅甸、泰国后称改为萨尔温江, 最后注入印度洋, 是一条国际性河流。怒江流域分布的物种十分丰富, 是世界生物多样性热点地区之一, 并且怒江特有物种也非常多。怒江是中国目前为数不多的、干流尚未修建水电站的主要河流之一, 其他方面的开发也很少, 因此被称为原生态河流。在能源日益紧张的今天, 怒江丰富的水电资源已引起人们的注意, 但是怒江流域分布的物种十分丰富, 是世界生物多样性热点地区之一, 并且怒江特有物种也很多, 水电的开发必然会对当地生态环境及生物造成重大影响, 特别是对鱼类的影响。由于怒江具有独特的生物多样性, 因此怒江水电开发的议题引起国内外广泛关注。怒江土著鱼类较多, 而且特有鱼类比例较高^[1], 很多鱼类经过长期演化, 已经适

应了怒江生态环境, 而水电站的开发将极大改变怒江的水文条件, 必然会对怒江鱼类产生重大影响。目前对怒江鱼类的研究进行得比较少, 主要集中在种类调查方面, 对它们遗传学的研究还未见报道。

缺须盆唇鱼 (*Placocheilus cryptonemus*), 又叫油鱼, 隶属于鲤科 (Cyprinidae)、野鲮亚科 (Labeoninae)、盆唇鱼属 (*Placocheilus*), 个体较小, 一般体长60~100 mm, 体近筒形, 主要分布在怒江中下游及其少数支流中, 喜栖于底质多岩石的江河下层, 伏居岩石间隙, 以刮食周丛生物为生。该物种为怒江所特有^[1]。其栖息地往往在沿江主要捕鱼区范围内。由于过度捕捞, 加之生境遭受破坏, 其种群数量急剧减少, 已被列入《中国濒危动物红皮书》^[2]。怒江的水电开发将会进一步对其生境造成破坏, 从而极大威胁缺须盆唇鱼的生存。迄今尚未见任何有关该鱼遗传背景的研究

收稿日期: 2008-10-31; 修订日期: 2009-01-22.

基金项目: 国家环境保护部基础研究项目资助 (EPA4261).

作者简介: 张东亚 (1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子生态学研究. E-mail: dyzhang@126.com

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

报道,因此,很有必要加强对缺须盆唇鱼的保护研究,以期今后制定合理的保护措施提供理论依据。

了解物种的遗传多样性水平有助于了解物种的进化历史和种群恢复潜力,从而制定有效的保护和管理对策。线粒体DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA), 具有母系遗传、较高突变率,突变固定后形成的多态位点可反映出群体遗传结构、种群分化和种属关系等特点,是群体遗传学和系统发育等研究的理想的分子标记^[3-4]。Cyt *b* 为线粒体DNA上的蛋白质编码基因,无论其结构、功能及蛋白质产物的生物化学性质都是较为清楚的基因,其进化速度适中,在研究鱼类群体遗传结构与系统发育关系中有广泛的应用^[5-6]。本研究以怒江缺须盆唇鱼为材料,利用PCR技术,对

mtDNA Cyt *b* 进行扩增测序分析,从遗传结构和遗传多样性的角度探讨遗传资源现状,为缺须盆唇鱼的资源评估和保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

共使用缺须盆唇鱼138尾,于2007年4月至2008年5月采自怒江干流,根据其分布情况设置5个采样点,处在怒江的中下游,从上到下依次为贡山、福贡、泸水、保山道街、龙镇桥(图1)。每个采样点的数量分别为:贡山群体(GS)26尾,福贡群体(FG)22尾,泸水群体(LS)28尾,保山道街群体(DJ)27尾,和龙陵县龙镇桥群体(LZ)35尾。每尾取尾鳍1~2 g,用95%的酒精保存带回实验室。

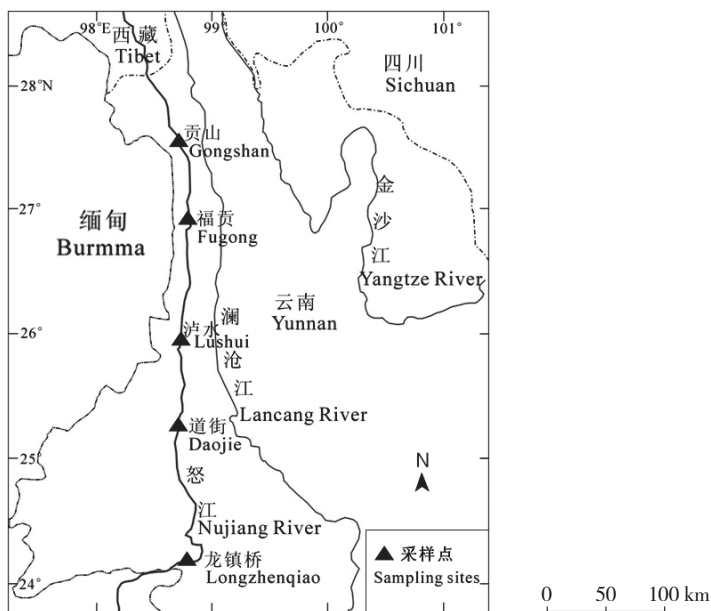


图1 怒江干流缺须盆唇鱼采样点分布图

Fig. 1 Map of sampling spots of *P. cryptonemus* along the Nujiang River

1.2 总DNA的提取

取尾鳍0.05 g左右,剪碎,加双蒸水浸泡3 h以上以去除酒精,然后加入500 μ L HOM buffer (80 mmol/L EDTA, 100 mmol Tris, 0.5% SDS) 缓冲液、10 μ L (10 mg/mL) 蛋白酶K,于55 $^{\circ}$ C恒温箱消化3 h以上,至组织消化完全。参照《分子克隆实验指南》^[7],采用苯

酚-氯仿法提取基因组DNA,然后用适量灭菌蒸馏水溶解,-20 $^{\circ}$ C存放。

1.3 Cyt *b* 序列的PCR扩增与测序

扩增Cyt *b* 序列的引物为L14322(5'-GACTTGAA GAACCACCGTTGTTATTCAAC-3')和H15576(5'-GC GCTAGGGAGGGAATTTAACCTCC-3')。PCR反应总体

积为50 μL ,其中10 $\times$ Buffer(含 Mg^{2+})5 μL 、*Taq* DNA聚合酶2 U、dNTP(10 mmol/L)0.4 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各2 μL 、适量浓度模板DNA 0.5 μL 、灭菌蒸馏水39.7 μL 。PCR扩增反应在9700型PCR扩增仪(美国ABI公司)上进行,反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性40 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s,共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min。PCR产物用0.8%的琼脂糖(TaKaRa公司)凝胶检测,用DNA回收试剂盒(Omega)回收目的DNA片段,回收产物送往北京利嘉泰成科技有限公司测序。每个样品均用正反2个引物分别测序。

1.4 数据分析

测得的DNA序列通过Lasergene V6软件进行编辑并辅以人工核查,用ClustalX1.81^[8]对序列进行比对;用DnaSP4.0软件^[9]计算多态位点、单倍型数、单倍型多样性指数(h)、核苷酸多样性指数(π)等;

用MEGA 3.1软件^[10]统计DNA序列的碱基组成,用Kimura2-papamter模型计算5个群体间的遗传距离,采用Kimura2-papamter距离矩阵,用邻接法(NJ)构建单倍型分子系统树,系统树中节点的自举置信水平应用自引导估计,循环验证次数为1 000;用Network4.0程序^[11]构建中介网络图,调查单倍型间的进化关系;用ARLEQUIN3.1^[12]中的分子变异分析(AMOVA)方法估算遗传变异在群体内和群体间的分布及遗传分化系数(F -statistics, F_{st}),计算并用排列测验法检测 F_{st} 的显著性(重复次数为1 000);碱基不配对分析^[13]和Fu' F_s 中性统计检验^[14]用来推断种群发生扩张的历史。

2 结果与分析

2.1 序列变异特征

对138尾缺须盆唇鱼Cyt b进行双向测序后,通过人工拼接并对序列比对分析后,得到1 140 bp的序列。经过分析,研究的所有序列中,A、T、C、G 4种碱基平均含量分别为28.2%、27%、29.2%、15.6%。A+T的含量为55.2%,明显高于G+C的含量44.8%。138尾样本中共检测到21种单倍型,21个突变位点,占位点

总数的1.84%,其中单一信息位点8个,占0.70%,其位置分别是5、67、102、201、331、339、969、985;简约信息位点13个,占1.14%,其位置分别是61、165、222、367、568、618、674、696、729、748、993、998、1 077,非同义突变8个,同义突变13个,颠换(Transversion)位点1个,其余均为转换(Transition)(表1),没有发现有3个或4个碱基变异的多态信息位点。

2.2 群体遗传多样性和遗传结构

贡山、福贡、泸水、保山道街和龙陵县龙镇桥5个缺须盆唇鱼群体的单倍型及遗传多样性参数如表2所示,从单倍型参数看,泸水群体的单倍型数及单倍型多样性指数最高,分别为11和 0.804 ± 0.070 ,最低的为保山道街群体,分别为4和 0.214 ± 0.103 ;在核苷酸参数中,泸水群体的核苷酸多态位点和核苷酸多样性最高,分别为13和 0.00264 ± 0.00026 ,其次为龙镇桥群体,分别为9和 0.00246 ± 0.00033 ,最低为保山道街群体,分别为5和 0.00032 ± 0.00019 。从以上结果可以看出,5个群体中,泸水群体遗传多样性最高,保山道街群体遗传多样性最低。

5个缺须盆唇鱼群体mtDNA Cyt b序列的遗传差异AMOVA分析结果如表3所示,群体间遗传分化系数 $F_{st}=0.3051$ ($P < 0.05$),表明在整个遗传变异中群体间占30.51%,其余的遗传变异来自于群体内,群体间具有程度较高的遗传分化。5个群体间,贡山和保山道街之间的遗传分化系数最高($F_{st}=0.55419$),其次是保山道街和龙陵县龙镇桥之间的遗传分化系数($F_{st}=0.51359$),贡山和福贡群体间的遗传分化系数最低($F_{st}=0.02372$)。5个群体中贡山和福贡之间没有显著的遗传分化($P > 0.05$),其他群体之间均存在极显著($P < 0.01$)的遗传分化。

5个缺须盆唇鱼群体的遗传距离结果见表4。从遗传距离来看,龙镇桥和福贡群体间的遗传距离最大为0.00345,其次为龙镇桥和贡山群体之间,遗传距离最小的是泸水和保山道街群体之间,为0.00092;各群体之间的遗传距离在0.00092~0.00345之间。这表明遗传距离大小与群体的地理距离存在一定正相关。

表1 缺须盆唇鱼各单倍型多态性位点分布
Tab.1 Informative sites in different haplotypes of *P. cryptonemus*

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable nucleotide sites																			
	1	1	2	2	3	3	3	5	6	6	6	7	7	9	9	9	9	9	0	1
	6	6	0	6	0	2	3	3	6	6	1	7	9	2	4	6	8	9	9	7
	5	1	7	2	5	1	2	1	9	7	8	8	4	6	9	8	9	5	3	8
Hap1	C	C	G	G	T	C	C	G	G	G	G	T	C	C	G	T	C	G	T	C
Hap2	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
Hap4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.
Hap7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	C	.	.
Hap8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	C
Hap9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	T	.	.	.	.	C	.	C
Hap10	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A	C	.	T	.	.	.	C	.	C
Hap11	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	C
Hap12	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	C
Hap13	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	C
Hap14	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	C
Hap15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	C	.	C
Hap16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	C	.	C
Hap17	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	C	.	C
Hap18	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	C	T	C
Hap19	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	C	T	C
Hap20	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	T	C
Hap21	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	C	.	.	C	T	C

表2 怒江干流5个缺须盆唇鱼群体的遗传多样性参数
Tab.2 Parameter summary of genetic diversity of different populations of *P.cryptonemus* in the Nujiang River

群体 Stock	样本数 <i>n</i>	单倍型数 Number of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity $\bar{x} \pm SD$	多态位点数 Number of polymorphic sites	核苷酸多样性 Nucleotide diversity $\bar{x} \pm SD$
贡山GS	26	6	0.560±0.106	6	0.001 26±0.000 31
福贡FG	22	6	0.784±0.063	6	0.001 66±0.000 24
泸水LS	28	11	0.804±0.070	13	0.002 64±0.000 26
道街DJ	27	4	0.214±0.103	5	0.000 32±0.000 19
龙镇桥LZ	35	7	0.692±0.069	9	0.002 46±0.000 33
总计 Total	138	21	0.826±0.021	21	0.002 15±0.000 12

表3 怒江干流5个缺须盆唇鱼群体间遗传差异的分子方差分析表 (AMOVA)
Tab.3 Analysis of molecular variance (AMOVA) among 5 populations of *P. cryptonemus* in the Nujiang River

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比例 / % Percentage of variance
群体间 Among population	4	15.946	0.134 16 V_a	30.51
群体内 Within population	133	40.634	0.305 52 V_b	69.49
总变异 Total variation	137	56.580	0.439 67	

注: 遗传分化系数 (F_{st}) = 0.305 1 ($P < 0.05$).

Note: Genetic fixations index (F_{st}) = 0.305 1 ($P < 0.05$).

表4 怒江干流5个缺须盆唇鱼群体间的遗传距离 (对角线下) 和遗传分化指数 (F_{st}) (对角线上)
Tab.4 Pairwise genetic distances (below diagonal) and fixation index (F_{st}) (above diagonal) among 5 populations of *P. cryptonemus* in the Nujiang River

群体 Population	贡山 GS	福贡 FG	泸水 LS	道街 DJ	龙镇桥 LZ
贡山GS		0.02372	0.20530**	0.55419**	0.36687**
福贡FG	0.00145		0.08568**	0.42222**	0.26157**
泸水LS	0.00189	0.00191		0.17398**	0.22412**
道街DJ	0.00159	0.00157	0.000 93		0.51359**
龙镇桥LZ	0.00338	0.00346	0.003 05	0.002 68	

注: ** 示差异极显著 ($P < 0.01$).

Note: ** means great significant difference ($P < 0.01$).

2.3 分子系统树

缺须盆唇鱼单倍型NJ分子系统树及在各群体中的分布如图2所示,群体间共享单倍型有6个,占单倍型总数的28.57%,其余15个单倍型均为某个群体所特有。共享单倍型中, Hap13为5个群体共有,拥有的频次最高,为45 (32.60%), Hap1、Hap3、Hap7、Hap14为3个群体共享, Hap18为2个群体共享; 特有单倍型中, Hap6、Hap15为贡山群体特有, Hap4、Hap5为福贡群体特有, Hap10、Hap11、Hap12、Hap16、Hap17为泸水群体特有, Hap8、Hap9为保山道街群体特有, Hap2、Hap19、Hap20、Hap21为龙镇桥群体特有, 这些单倍型出现的频率很低, 只有1个或很少几个样本, 是否可以作为区分不同群体的遗传标记, 还需进一步研究。

缺须盆唇鱼单倍型网络图如图3所示。网络分析表明, 谱系由3个亚枝构成, 亚枝Hap13、亚枝Hap3和Hap18, 分别包含65、49和24个个体以及11、7和3个单倍型。亚枝Hap13与另外2个亚枝之间分别由2

和3步突变距离相分离。除亚枝Hap18外, 另外2个亚枝的单倍型均显示为明显的星状分布, 并且各自含有1个高频率分布的优势单倍型 (单倍型Hap13, 45个个体; 单倍型Hap3, 29个个体) 分别位于各亚枝的中央。特有单倍型分散地分布在网络图中, 未形成特有的进化枝。各亚枝表现出明显的地理分布特征。亚枝Hap13主要被泸水和道街群体共享, 亚枝Hap3主要被贡山和福贡群体共享, 其中大部分样品分布在贡山, 亚枝Hap18主要分布在龙镇桥群体。mv1和mv2为2个推测的但未检测到的单倍型。

2.4 种群扩张

用138个个体的mtDNA Cyt b区1 140个碱基序列构建两两间的矩阵, 个体间错配碱基的分布曲线如图4所示, 曲线呈明显的单峰形, 采用1 000次的重复模拟; 另外, 采用Fu' F_s 中性检验显著偏离中性突变, 在1 000次模拟取样的情况下, 检验得到一个较大的负 F_s (-7.664) 值和差异显著的 P 值 ($P < 0.01$)。

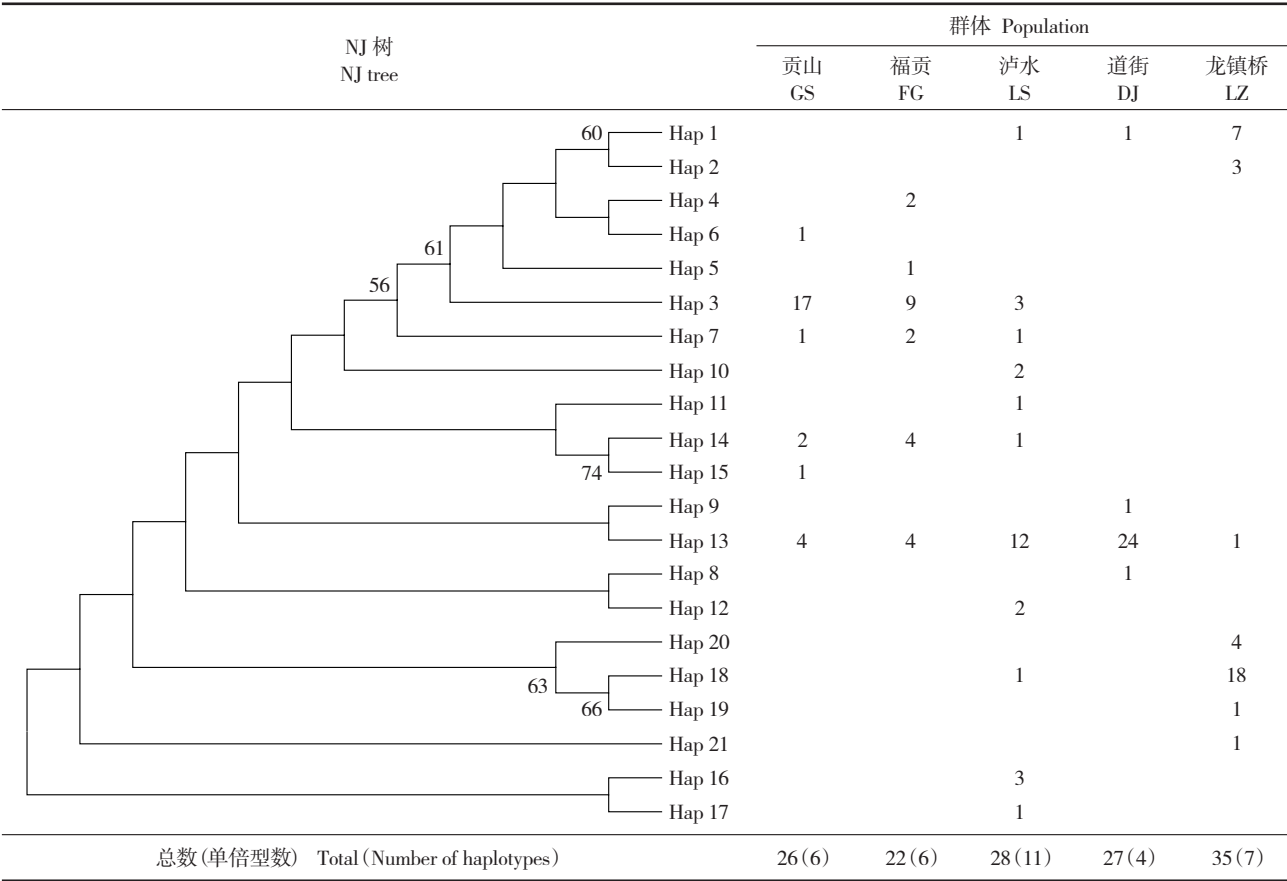


图2 缺须盆唇鱼5个群体21种单倍型的分子系统树及在各群体中的分布
节点数字表示bootstrap支持率.

Fig. 2 NJ molecular phylogenetic tree of 21 haplotypes and their distributions in 5 populations of *P. cryptonemus*
Numbers at nodes indicate the percent age of bootstrap support after 1 000 replicates.

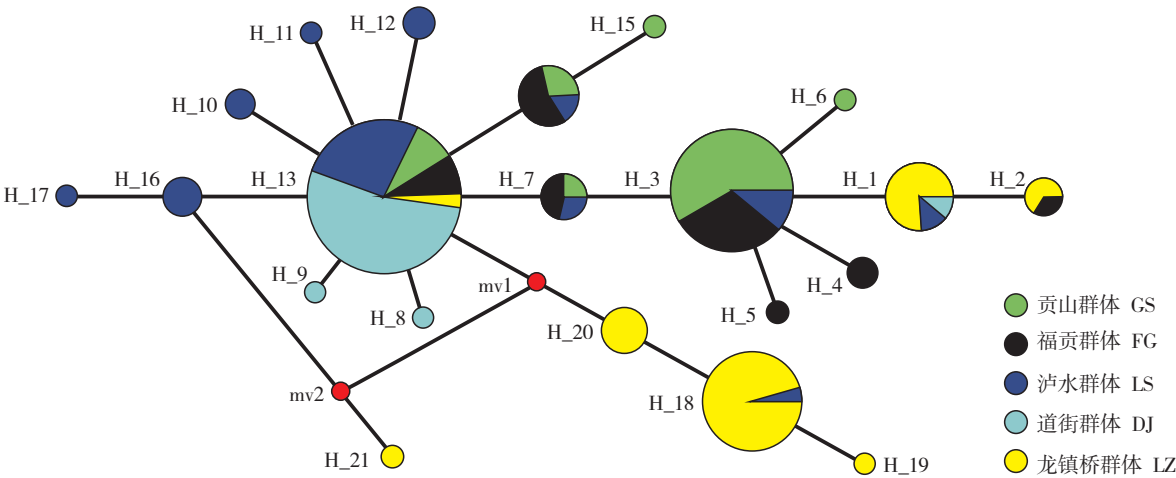


图3 怒江缺须盆唇鱼5个群体单倍型网络图
圆圈面积表示单倍型分布的频率

Fig. 3 Haplotype network of 5 populations of *P. cryptonemus* in the Nuijiang River
Size of circle denotes haplotype frequency.

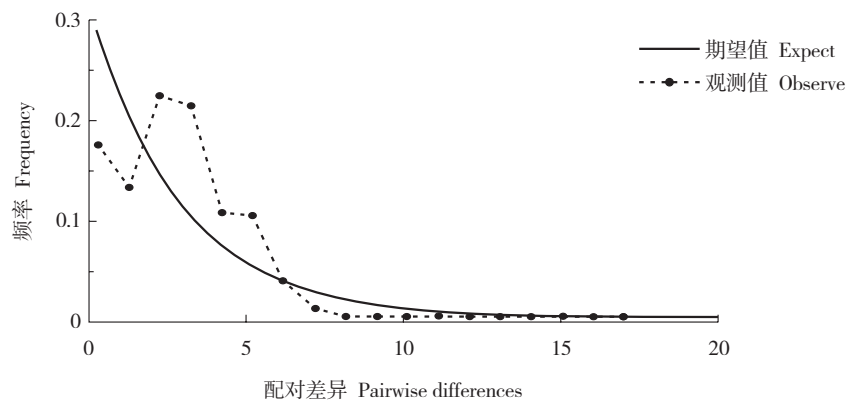


图4 怒江缺须盆唇鱼 mtDNA Cyt b 序列错配碱基分布图

Fig.4 Mismatch distribution of mtDNA Cyt b sequences of *P. cryptonemus* in the Nujiang River

3 讨论

3.1 遗传多样性

5个群体138尾缺须盆唇鱼样本中, mtDNA Cyt b 碱基组成AT含量为55.2%,明显高于GC含量44.8%,这一结果与其他一些脊椎动物类似^[15]。突变位点21个,单倍型21种, Cyt b 平均核苷酸多样性指数(π)为 $0.002\ 15 \pm 0.000\ 12$,与一般鲤科鱼类相比,保持较低的水平,属于较小种内变异的种群^[16-18]。动物遗传多样性与个体大小呈负相关,个体越大繁殖周期越长则遗传变异越小^[19-20]。怒江缺须盆唇鱼个体小,繁殖周期较短,种群的遗传多样性应当相对高,而研究中得到的结果恰好相反。分析其原因,可能与其种群历史演化有关。

种群历史演化通常通过2种方法来检测,其一是碱基不配对分析,这种方法是基于无限位点模式(Infinite-site model)对样本中两两序列进行差异分析^[21],个体间碱基不配对分布曲线呈明显的单峰形被认为种群历史有扩张现象;其二是通过 F_u' F_s 中性检验, F_s 呈负值和差异显著的 P 值被认为种群在历史上有扩张迹象。从2种方法检测的结果来看,碱基不配对分布曲线呈明显的单峰形, F_u' F_s 中性检验得到一个较大的负 F_s (-7.664)值和差异显著的 P (<0.01)值,2种方法均在1 000次模拟取样的情况下完成,这些结果说明缺须盆唇鱼在历史上可能发生过种群扩张,也就是经历过种群瓶颈,种群在致危因素作用下,数量

快速下降成为一小群体,而后回升。使用已校正的鲤科鱼类Cyt b通常采用的0.76% /Ma的进化率^[22],根据核苷酸多样性(π),估算扩张时间约在0.282 9 Ma,因而推断这一时期该种群经历了一次严重的“瓶颈效应”的打击^[23]。怒江形成于第四纪^[24-25]。第四纪以来,青藏高原经历了数次地质和气候的改变^[26],生活在高原或周边水域中的鱼类或多或少要经历适应选择的“瓶颈”,从而可能导致遗传多样性的贫乏;其次,缺须盆唇鱼栖息地往往是沿江主要捕鱼区,过渡捕捞、生境破坏、数量不断减少、近亲繁殖等可能也是造成遗传多样性低的一个原因。

3.2 遗传分化

AMOVA分析显示的固定值 F_{st} 是用来测量群体之间遗传分化的指标, F_{st} 越小,说明群体间发生遗传分化越低。本研究中,群体间遗传分化系数 $F_{st}=0.305\ 1$ ($P<0.05$),表明在整个遗传变异中群体间占30.51%,其余的遗传变异来自于群体内,群体间具有程度较高的遗传分化。除贡山群体和福贡群体之间的 F_{st} 值仅为0.023 72,遗传分化较小,遗传分化不显著($P>0.05$)外,这2个群体分别与其他3个群体间及3个群体之间的 F_{st} 达到了极显著($P<0.01$) (表4),说明贡山群体和福贡群体分别与其他3个群体间及3个群体之间发生了极显著的群体遗传分化。

一般认为,由于地理隔离造成鱼类基因交流的完全中断,或同一水域中不同栖息环境的存在部分

地限制鱼类的基因交流,是物种形成种群结构甚至分化出亚种的重要因素^[27]。赵凯等^[28]研究了黄河花斑裸鲤,结果表明存在明显的种群结构,其主要原因是黄河上游几大峡谷在一定程度上阻碍了花斑裸鲤群体内的基因交流;有研究表明^[29],由于青藏高原的强烈抬升,中间山脉隆起,托索湖湖盆下沉,导致了黄河水系和柴达木盆地托索湖流域的完全隔离,原生活在同一水域的黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)群体内基因交流的完全阻断,结果使黄河裸裂尻形成了一定的种群遗传结构,但还未达到种级的显著分化水平;程起群等^[30]利用Cyt *b*基因标记方法探讨了凤鲚3个群体的遗传结构,由于地理隔离完全阻断了群体间的基因交流,结果长江群体和闽江以及珠江群体间的分化已达亚种水平;还有研究指出^[31],由于青藏高原的阶梯式隆起,从而影响高原鱼类的种群遗传结构,使之不断分化。怒江流域自然地理和气候复杂多样,上游地处青藏高原东南部,属高原地貌,现代冰川发育;中游处于青藏高原向云贵高原过渡的横断山脉峡谷区;下游六库以南为云贵高原区,属河谷区,地势相对较低;上中下游无论气候、海拔、水文、生境都有明显的差异^[24,32]。因此,同一水域栖息环境的不同可能部分地限制了群体间的基因交流;另外,再加上缺须盆唇鱼个体小,口吸盘,附着河底,活动能力弱,游动范围不大等特点^[1],一定程度上也限制了群体间广泛的基因交流,导致种群的遗传分化。

3.3 资源保护

缺须盆唇鱼为怒江4种濒危鱼类之一,过度捕捞是该种致危的主要因素^[33],再加上沿江栖息地破坏,数量急剧减少。过渡捕捞还会进一步导致群体遗传多样性降低,进而危及其自身的延续能力,加快濒危程度,因此,必须加强对缺须盆唇鱼的保护。本研究初步反映了缺须盆唇鱼的遗传背景,为制定相关的保护措施提供了理论依据。可以通过多种途径加强对缺须盆唇鱼资源的有效保护:(1)严格控制对缺须盆唇鱼的捕捞,严禁使用带有毁灭性破坏的电鱼、炸鱼、毒鱼等捕捞方法;(2)加强对缺须盆唇鱼

繁殖生物学及早期生活史的研究,确定其产卵场的分布和规模,评价水利工程建设将对其产生的影响;(3)开展人工繁殖技术研究,在建设水电站的同时,建设濒危鱼类增殖保护站,进行人工增殖放流;(4)为了保持其进化能力、适应不同环境以及可持续利用,可以采取异地保护“基因库”的办法。

本研究利用mtDNA Cyt *b*对缺须盆唇鱼遗传背景、遗传结构及遗传变异水平进行分析,为其种群遗传多样性评估和保护利用提供了依据。但要想从遗传多样性的角度全面了解和评估缺须盆唇鱼的资源,还需要建立包括用AFLP、微卫星DNA和其他相关技术获得结果的分子数据库。

参考文献:

- [1] 褚新洛,陈银瑞.云南鱼类志:上册[M].北京:科学出版社,1989.
- [2] 汪松,乐佩琦,陈宜瑜.中国濒危动物红皮书:鱼类[M].北京:科学出版社,1998.
- [3] Rosel P E, Rojas-Bracho L. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* (Norris and Macfarland) [J]. Mar Mammal Sci, 1999, 15 (4): 990-1 003.
- [4] Cary R, Carvalho. Population genetics: principle and applications for fisheries scientist [J]. Fish and Fisheries, 2004, 5 (1): 94-95.
- [5] Iwin D W, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals [J]. Mol Evol, 1991, 32: 128-144.
- [6] Cantatore P, Roberti M, Pesole G. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequence in some perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals [J]. Mol Evol, 1994, 39: 589-597.
- [7] 黄培堂(译).分子克隆实验指南:第3版[M].北京:科学出版社, 2002: 461-469.
- [8] 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, 25: 4 876-4 882.
- [9] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2 496-2 497.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [11] Bandelt H, Forster P, Rohl A. Median joining networks for inferring

- intraspecific phylogenies [J]. Mol Biol Evol, 1999, 16: 37–48.
- [12] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver.3.01: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1: 47–50.
- [13] Schneider S, Excoffier L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA [J]. Genetics, 1999, 152: 1 079–1 089.
- [14] Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. Genetics, 1997, 147: 915–925.
- [15] Saccone C, Pesole G, Shiba E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA [J]. Mol Evol, 1987, 26: 205–211.
- [16] Perdices A, Cunha C, Coelho M M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* populations on the upper and middle Yangtze drainage inferred from cytochrome *b* sequences [J]. Mol Phyl Evol, 2004, 31: 192–193.
- [17] Alves M J, Coelho H, Collares-Pereira M J, et al. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaecypris hispanica*: importance for conservation [J]. Heredity, 2001, 87: 463–473.
- [18] Mesquita N, Carvalho G, Shaw P, et al. River basin-rated genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis [J]. Heredity, 2002, 86: 253–264.
- [19] Frankham R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife [J]. Cons Biol, 1996, 10 (6): 1 500–1 508.
- [20] Martin A P. Mitochondrial DNA Sequence evolution in sharks: rates, patterns, and phylogenetic inferences [J]. Mol Biol Evol, 1995, 12: 1 114–1 123.
- [21] Rogers A R, Harpending H. Population growth curves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. Mol Biol Evol, 1992, 9: 552–569.
- [22] Zardoya R, Doadrio I. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids [J]. Mol Evol, 1999, 49: 227–237.
- [23] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implication for introduction [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48 (suppl.1): 80–94.
- [24] 何浩生, 何科昭, 马篆阶. 云南境内怒江形成时代的研究 [J]. 云南地质, 1992, 11 (4): 348–355.
- [25] 李光涛, 陈国星, 苏刚, 等. 滇西地区怒江河流阶地、夷平面变形反映的第四纪构造运动 [J]. 地震, 2008, 28 (3): 125–132.
- [26] 李吉钧, 方小敏, 潘保田, 等. 新生代晚期青藏高原强烈隆起及其对周边环境的影响 [J]. 第四纪研究, 2001, 21 (5): 381–391.
- [27] Cassel A, Tammaru T. Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (*Coenonympha hero*: Lepidoptera, Nymphalidae): implications for conservation [J]. Conservation Genetics, 2003, 4: 83–93.
- [28] 赵凯, 李俊兵, 杨公社, 等. 青海湖及其相邻水系特有裸鲤属鱼类的分子系统发育 [J]. 科学通报, 2005, 50 (13): 1 348–1 355.
- [29] 赵凯, 杨公社, 李俊兵, 等. 黄河裸裂尻鱼群体遗传结构和 Cyt *b* 序列变异 [J]. 水生生物学报, 2006, 30 (2): 129–133.
- [30] 程起群, 马春艳, 庄平, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因标记探讨凤鲚 3 群体遗传结构和进化特征 [J]. 水产学报, 2008, 32 (1): 1–7.
- [31] 陈宜瑜, 陈毅峰, 刘焕章. 青藏高原动物地理区的地位和东部界线问题 [J]. 水生生物学报, 1996, 20 (2): 97–102.
- [32] 刘冬英, 沈燕舟, 王政祥. 怒江流域水资源特征分析 [J]. 人民长江, 2008, 39 (17): 64–66.
- [33] 徐伟毅, 缪祥军, 邱家荣, 等. 论怒江鱼类保护的重要性及措施 [J]. 云南农业, 2008, 3: 24–27.

Population genetic structure analysis of endangered species *Placocheilus cryptonemus* in the Nujiang River based on Cyt *b* sequences of mtDNA

ZHANG Dong-ya^{1,2}, WANG Deng-qiang^{1,3}, LIU Shao-ping¹, GUO Zhi-qiang¹, YUE Xing-jian⁴, DENG Hua-tang¹, CHEN Da-qing^{1,3}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 4. College of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Placocheilus cryptonemus*, a small freshwater fish, which is only endemic to the Nujiang River, mainly inhabits in the middle and lower reaches of the Nujiang River. The stock declined drastically in recent years due to over-fishing, whereas little knowledge is available about its population genetic structure. Here, the mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome *b* genes of *Placocheilus cryptonemus* were amplified by means of polymerase chain reaction (PCR) and then sequenced to test the population genetic structure and genetic diversity. Totally 138 individuals were collected from five sites (populations) in Nujiang River, including Gongshan (GS, $n=26$), Fugong (FG, $n=22$), Lushui (LS, $n=28$), Daojie (DJ, $n=27$), Longzhenqiao (LZ, $n=35$). The results showed that 21 variable sites were detected in the aligned sequences of 1 140 bp, and 21 haplotypes were recovered among the specimens, with only one haplotype shared among all populations. The global haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were 0.826 and 0.002 15, respectively. Within populations, LS gained the highest values of genetic diversity, which were 0.804 and 0.00264 for h and π respectively, DJ gained the lowest values of genetic diversity, which were 0.214 and 0.000 32 for h and π respectively. The pairwise Kimura 2-parameter genetic distances between populations were calculated, and the distance between FG and LZ displayed the highest, up to 0.034 6, while that between LS and DJ was the lowest to 0.000 93. The neutral test of F_u F_s showed a significant negative value (-7.664) and the pairwise nucleotide differences distribution showed a singlet, indicating population expansion in history. The fixation indices (F_{st}) of analysis of molecular variance (AMOVA) among populations was 0.305 1 ($P < 0.05$), which signaled strong population structure. The data here should be important and useful for making scientific strategy for the natural resource protection of *Placocheilus cryptonemus* during the development of Nujiang River. Future research should focus on using nuclear and more polymorphic markers such as AFLP or microsatellite DNA to obtain the detail information of the fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (4): 477–486]

Key words: Nujiang River; *Placocheilus cryptonemus*; population genetic structure; genetic diversity; Cyt *b*

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