

利用 CR 和 Cyt b 基因序列组合评价珠江和长江水系赤眼鳟的遗传多样性

杨慧荣¹ 刘丽¹ 龚世园² 赵会宏¹ 孙际佳¹ 陈彦珍¹

1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 利用 PCR 技术扩增得到珠江和长江水系共 24 个赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)个体 mtDNA CR 和 Cyt b 基因片段, 并测定其序列。对 1 345 bp 的组合序列进行分析, 共检测到 23 个单倍型, 22 个单突变位点, 102 个简约信息位点。在 139 个突变位点中: 转换位点 100 个, 颠换位点 30 个, 插入/缺失位点 14 个; A+T 的含量(61.5%)明显高于 C+G 的含量(38.5%)。4 个水域个体间的遗传变异率在 0~7.43% 之间, 组合序列的单倍型多样性(H)、平均核苷酸差异数($K \pm S_D$)和核苷酸多样性(π)分别为 0.977 8、17.271 0 和 0.029 7, 均表现出较高的遗传多样性水平。对 4 个群体的组合序列进行 F_{ST} 分析, 并构建分子系统树和单倍型进化网络关系图。结果表明: 不同水系群体间存在显著遗传差异, 而同一水系内的不同群体间差异不显著。AMOVA 分析表明: 梧州、新丰、武汉和宜昌 4 个群体间显著性的遗传分化主要由不同水系群体间的遗传差异所致, 珠江或长江流域内群体间不存在遗传分化, 进一步印证了 F_{ST} 的分析结果。珠江和长江水系间的遗传分化主要是因地域隔离导致的生殖隔离, 分属“长江群体”或“珠江群体”。但在同一水系内, 主要因为赤眼鳟的半洄游习性使得它们之间存在广泛的基因交流, 没有出现遗传分化。

关键词 赤眼鳟; 线粒体 DNA; CR; Cyt b; 遗传多样性; 珠江; 长江

中图分类号 Q 953.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0084-08

赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)为鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、赤眼鳟属(*Squaliobarbus*), 是广泛分布在我国主要水系的野生经济鱼类。赤眼鳟是我国养殖的重要经济鱼类之一, 因其抗病力强、生长快、食性杂、肉质细嫩鲜美等特点, 深受养殖户和消费者的喜爱。但是近年来的水环境污染以及长期对渔业资源的不合理开发利用, 导致野生赤眼鳟资源衰退、种质退化。目前, 国内外有关赤眼鳟群体遗传学与基因多样性的研究, 鲜有文献报道。

随着分子生物学技术向生物学各研究领域的渗透, 鱼类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 作为分子标记, 已成为研究鱼类系统演化关系和群体遗传结构的重要工具^[1-2]。mtDNA 为共价闭合环状 DNA, 是细胞核外具自主复制、转录和翻译能力的遗传因子, 含有 1 条轻链, 1 条重链。它相比核 DNA 而言, 是一个相对独立的复制单位, 具有

结构简单、分子小、进化速度快、不同区域进化速度存在差异等优点。基于此, mtDNA 已成为鱼类分子生态学、进化遗传学、保护生物学以及遗传多样性等研究的重要手段。其中, 位于 tRNA^{Pro} 和 tRNA^{Phe} 基因之间的 D 控制区(control region, CR) 是整个 mtDNA 基因中进化速度最快的区域, 也是序列和长度变异最大的区域^[3], 适用于种间遗传多样性的分析, 也适用于种内遗传变异的检测。Cyt b 基因是 mtDNA 的编码基因, 其进化速度适中, 是探讨群体遗传分化程度和遗传多样性状况的良好标记^[4-6]。笔者以赤眼鳟为研究对象, 以 mtDNA 的 CR 和 Cyt b 基因序列为分子标记, 对珠江水系和长江水系不同水域赤眼鳟群体进行研究, 综合 2 个指标分析其遗传变异, 查明其遗传多样性状况和群体遗传结构, 以期对赤眼鳟多样性保护提供必要的技术支持和遗传背景资料。

收稿日期: 2012-09-06

基金项目: 农业部公益性行业专项(201303048)、国家科技基础条件平台建设项目(2008DKA30470-010)、农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金(24-9)和广东省海洋渔业科技推广专项(A201201E04)

杨慧荣, 博士研究生, 讲师。研究方向: 渔业种质资源、鱼类生理与分子生物学。E-mail: hry@scau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

于2006年6月至2007年6月,分别于珠江水系的新丰和梧州江段(编号分别为XF群体、WZ群体)和长江水系的武汉、宜昌江段(编号为WH群体、YC群体)采集赤眼鳟样本,共计24尾,均为野生群体。XF群体、WZ群体分别代表了珠江水系的东江和西江流域;WH群体取自武汉市境内江段,属于长江中游水域;YC群体取自宜昌巴东县的官渡口,属于长江上游干流巫峡的起点。野外现场取背部肌肉置于液氮罐中带回实验室,超低温保存,剩余样品用福尔马林固定保存。

1.2 试验方法

基因组DNA的提取参照文献[7]的方法。PCR反应在ABI PCR仪上进行。Cyt b和CR引物由上海生工生物技术有限公司合成。Cyt b引物序列如下: H15915: 5'-CTCCGATCTCCGGATTA-CAAGAC-3', L14724: 5'-GACTTGAAAAAC-CACCGTTG-3'^[8]。CR引物序列如下: DH: 5'-ATCTTAGCATCTTCAGTG-3', DL: 5'-AC-CCCTGGCTCCCAAAGC-3'^[8]。反应总体积20 μ L,其中模板DNA 20 ng, Taq Polymerase 0.2 μ L (5 U/ μ L),引物L和D(10 μ mol/L)各1 μ L, 10 \times Taq Buffer 2 μ L, dNTPs(1 mmol/L)1.6 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L)1 μ L,无离子超纯水13.2 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min后,94 $^{\circ}$ C 45 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共进行35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。每次PCR反应均设无菌水替代模板DNA的空白对照。扩增产物经1.5% TBE琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,凝胶成像系统(SYNGENE)检测、拍照。

1.3 测序与数据分析

产物纯化和测定由华大基因有限公司完成,各样品均采用双向测序获得赤眼鳟CR和Cyt b序列,经Seq Man II (DNASTAR Inc)软件拼接后进行人工校对,然后将各个体的CR和Cyt b基因序列一一对应拼接组合。用软件Clustal-X对所获得拼接序列进行比对分析^[9];用软件DAMBE检测转换、颠换是否达饱和,统计单倍型并作图;用软件ARLEQUIN^[10]计算单倍型多样性(haplotype diversity, H)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)和平均核苷酸差异数($K \pm S_D$)3项群体遗传多样性指标,

群体间的分化指数(F -statistics, F_{ST})^[11]以及群体遗传变异的分子变异等级分析(analysis of molecular variance, AMOVA)^[12];公式 $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/2$ 计算得到群体间的基因流^[13];MEGA5软件^[14]统计DNA序列的碱基组成、转换/颠换和平均转换/颠换率、单突变位点、简约信息位点、插入/缺失位点数;个体间、群体间和群体内的遗传变异率由Kimura双参数模型(Kimura 2-parameter)计算所得;用邻接法(neighbor-joining, NJ)和最大似然法(maximum-likelihood, ML)构建聚类关系树。

2 结果与分析

2.1 CR+Cyt b组合序列组成信息

用MEGA4.1软件将各个体747 bp的CR和598 bp的Cyt b基因序列一一对应拼接,得到总长为1 345 bp的拼接组合序列。由MEGA5软件对1 345 bp组合序列进行分析:24个个体组合基因片段中,A、T、C、G碱基的平均含量分别为31.2%、30.3%、24.4%、14.1%,其中,A+T的含量(61.5%)明显高于C+G的含量(38.5%);共检测到23个单倍型,22个单突变位点,102个简约信息位点;在139个突变位点中:插入/缺失位点14个(均发生在CR序列区),转换位点100个,颠换位点30个(其中有5个位点既发生了转换,又发生了颠换),平均的转换发生频率是颠换的3.073,转换明显高于颠换(表1)。由软件DAMBE统计可知:在24个个体中共检测出23个单倍型,由转换、颠换对遗传距离图(省略)可知:转换和颠换数没有达到平台效应,即没有达到饱和状态,说明供统计分析的数据准确可靠。

2.2 CR+Cyt b组合序列遗传变异分析

两水系4个不同水域赤眼鳟组合序列各个体间的转换/颠换数及遗传变异率由软件MEGA5计算所得。各个体间的转换位点为0~75,颠换位点为0~19,均为转换大于颠换。赤眼鳟各个体与青鱼的遗传变异率在14.04%~14.69%,赤眼鳟各个体间的遗传变异率在0~7.43%之间。4个群体赤眼鳟(XF、WZ、WH、YC)群体间的遗传距离值为0.005 4~0.067 7,群体内的遗传距离分别是0.011 1、0.011 4、0.006 4和0.005 0,总平均遗传距离为0.038 3(不含外群)(表2)。将长江和珠江水系赤眼鳟分别作为一个群体(CJ群体和ZJ群体)进行比较分析,CJ群体和ZJ群体间的遗传距离为0.065 7,

表 1 赤眼鳟线粒体 CR、Cyt *b* 及组合序列碱基组成及变异分析

Table 1 Composition and variability of the analyzed mtDNA of *S. curriculus*

基因 Gene	单倍型 Haplotype	比对碱基 位点数 Number of aligned sites	多态位点数 (比例/%) Number and percent of polymorphic sites	简约信息位 点数(比例/%) Number and ercent of parsim-info	单突变位点数 (比例/%) Number and percent of singleton	转换、颠换 数及比值 Transition, transversion and Ts/Tv	A+T/ %	C+G/ %
CR	18	598	67(11.20)	34(5.69)	18(3.01)	40/15(3.192)	66.8	33.2
Cyt <i>b</i>	18	747	72(9.63)	68(9.10)	4(0.54)	60/15(4.636)	55.7	44.3
CR+ Cyt <i>b</i>	23	1 345	139(10.33)	102(7.58)	22(1.64)	100/30(3.073)	61.5	38.5

表 2 两大水系 4 个不同水域赤眼鳟 CR+Cyt *b* 组合序列群体内、群体间遗传距离

Table 2 The intrapopulation (on triangle) and interpopulation (lower triangle) genetic distances based on the CR+Cyt *b* combined mtDNA of *S. curriculus*

群体 Population	梧州 WZ	新丰 XF	武汉 WH	宜昌 YC
梧州 WZ	0.011 4			
新丰 XF	0.010 9	0.011 1		
武汉 WH	0.067 7	0.065 5	0.006 4	
宜昌 YC	0.066 0	0.063 8	0.005 4	0.005 0

群体内的遗传距离分别为 0.005 6 和 0.011 1。

将珠江和长江水系赤眼鳟分别作为一个群体即 ZJ 群体和 CJ 群体,分析得到 6 个群体的 CR+Cyt *b* 组合序列的单倍型多样性(*H*)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数($K \pm S_D$)(表 3)。4 个群体间的 F_{ST} 及 N_m 值见表 4,ZJ 和 CJ 群体间的 F_{ST} 及 N_m 值分别为 0.873 5 和 0.072 4,差异较显著。而不同水

系群体间的遗传差异极其显著,如宜昌群体与新丰群体、梧州群体间,武汉群体与新丰群体、梧州群体间;同一水系内的不同群体间遗传差异不显著,如梧州群体和武汉群体间,武汉群体和宜昌群体间。分别将梧州、新丰、武汉和宜昌四群体,梧州和新丰两群体,武汉和宜昌两群体作为一个组进行群体间的分子变异等级分析(AMOVA)(表 5),结果表明:4 个群体总的遗传分化指数 $F_{ST} = 0.817 6$ ($P=0.000 0 < 0.05$),表明群体间存在着显著性遗传变异,其中 81.76% 遗传变异存在于群体间,群体内的遗传变异对总的遗传变异贡献较小,仅 18.24%。珠江两群体的遗传分化指数 $F_{ST} = -0.034 9$ ($P=0.588 5 \pm 0.014 8 > 0.05$),长江两群体的遗传分化指数 $F_{ST} = -0.047 9$ ($P=0.818 2 \pm 0.010 1 > 0.05$),进一步表明了珠江和长江群体内部不存在遗传分化。

表 3 4 个赤眼鳟群体相关遗传多样性参数

Table 3 Indexes of genetic diversity of the four populations of *S. curriculus*

群体 Population	样品数(<i>N</i>) No. of individuals	单倍型多样性(<i>H</i>) Haplotype diversity	平均核苷酸差异数 Mean number of pairwise differences ($K \pm S_D$)	核苷酸多样性(π) Nucleotide diversity
梧州 WZ	6	1.000 0 \pm 0.096 2	15.157 4 \pm 7.921 0	0.011 4 \pm 0.006 9
新丰 XF	6	1.000 0 \pm 0.096 2	14.829 1 \pm 7.756 6	0.011 1 \pm 0.006 7
武汉 WH	6	1.000 0 \pm 0.096 2	8.510 9 \pm 4.592 1	0.006 4 \pm 0.004 0
宜昌 YC	6	1.000 0 \pm 0.096 2	6.697 5 \pm 3.682 2	0.005 0 \pm 0.003 2
珠江 ZJ	12	0.984 8 \pm 0.040 3	14.717 6 \pm 7.093 1	0.011 1 \pm 0.006 0
长江 CJ	12	1.000 0 \pm 0.034 0	7.414 6 \pm 3.730 0	0.005 6 \pm 0.003 2
总计 Total	24	0.996 4 \pm 0.013 3	50.927 7 \pm 22.835 8	0.038 3 \pm 0.019 1

表 4 群体间的 F_{ST} (对角线下方)和 N_m (对角线上方)¹⁾

Table 4 Population pairwise F_{ST} (below diagonal) and N_m (above diagonal) values

群体 Population	梧州 WZ	新丰 XF	武汉 WH	宜昌 YC
梧州 WZ	/	-14.834 9	0.075 6	0.071 1
新丰 XF	-0.034 9	/	0.077 3	0.072 6
武汉 WH	0.868 6 *	0.866 0 *	/	-10.938 4
宜昌 YC	0.875 5 *	0.873 2 *	-0.047 9	/

1) * 表示差异显著。下同 * means $P < 0.05$. The same as below.

表 5 群体间遗传变异的分子变异等级分析 (AMOVA)

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of population genetic variation

群体 Population	变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	变异百分率/% Percentage of variation	F-统计量 F _{ST}	P 值 P-value
四群体 4 population (WZ, XF, WH, YC)	群体间 Among populations	3	472.680	25.318 4	81.76	0.817 6	
	群体内 Within populations	20	112.988	5.649 4	18.24		0.000 0±0.000 0*
	总体 Total	23	585.668	30.967 0			
珠江二群体 2 population (WZ, XF)	群体间 Among populations	1	5.981	-0.252 7	-3.49	-0.034 9	
	群体内 Within populations	10	74.966	7.496 6	103.49		0.588 5±0.014 8
	总体 Total	11	80.947	7.243 9			
长江二群体 2 population (YC, WH)	群体间 Among populations	1	2.759	-0.173 8	-4.79	-0.047 9	
	群体内 Within populations	10	38.021	3.802 1	104.79		0.818 2±0.010 1
	总体 Total	11	40.781	3.628 3			

2.3 分子系统树

用 MEGA4.1 中的“NJ”法和“ML”法构建分子系统树,以青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) CR + Cyt *b* 组合序列为外群,用 Bootstrap 1 000 给出各支的置信度。两大水系 4 个不同水域赤眼鳟 24 个个体的系统树明显分为 2 支:长江水系 12 个个体聚

为一支,珠江水系 12 个个体聚为另一支,且置信度均为 100,各大水系内的不同水域个体却混杂在一起,其拓扑结构见图 1。利用 Network4610 软件构建的赤眼鳟 mtDNA CR+Cyt *b* 单倍型网络关系见图 2,网络分析结果表明,谱系由 2 个亚枝构成:亚枝 A 和亚枝 B。亚枝 A 包含珠江水系的 12 个个体

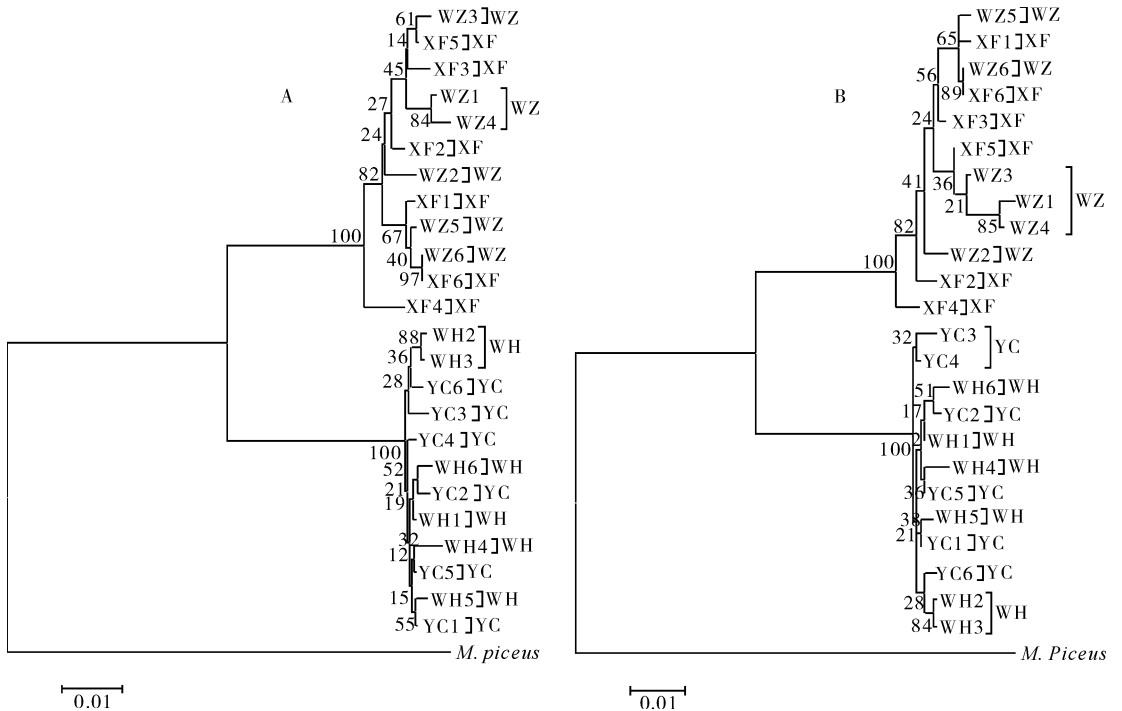
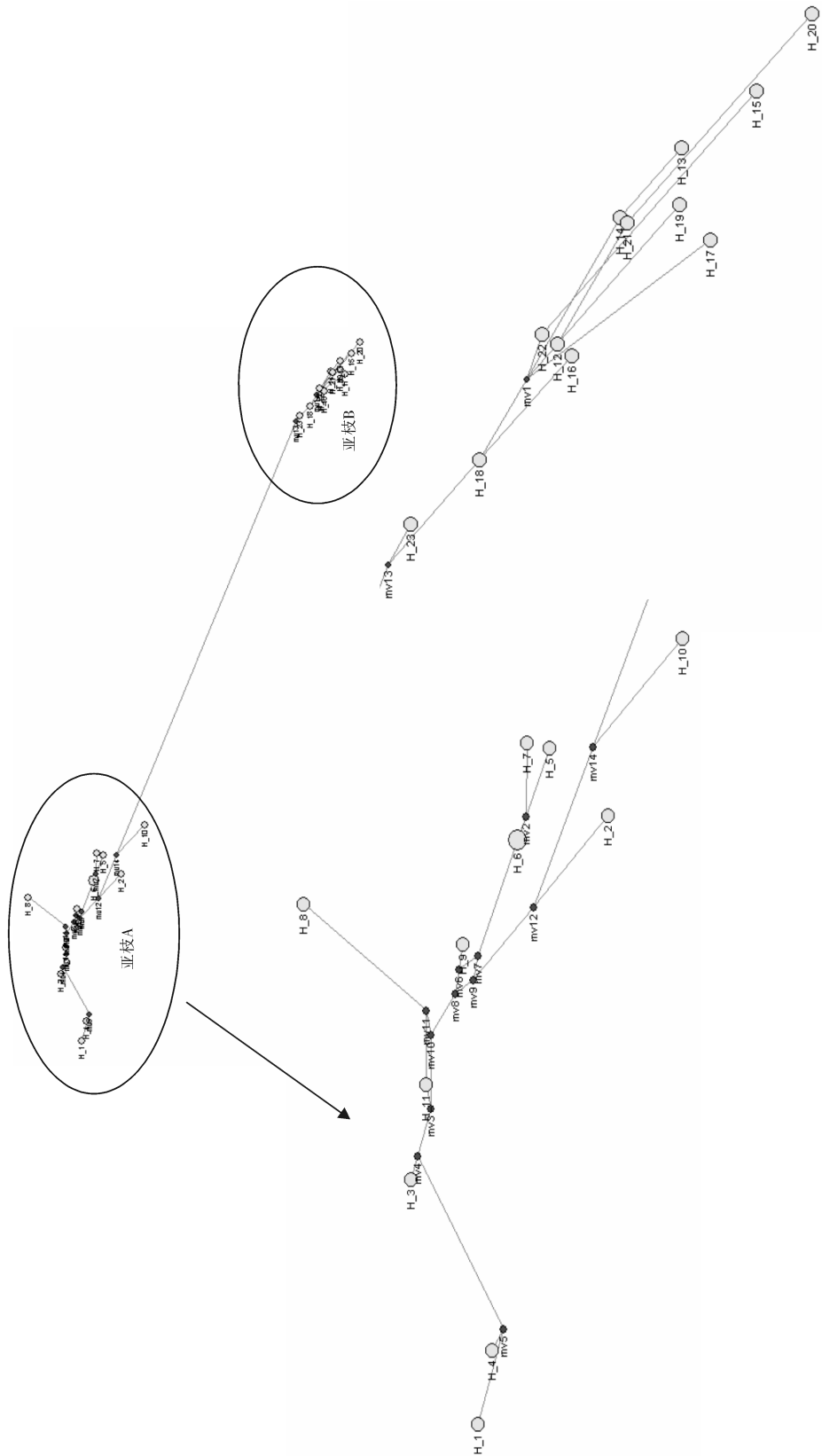


图 1 CR+Cyt *b* 基因序列的 NJ(A)和 ML(B)分子系统树(数值表示 1 000 次重复抽样的百分比)

Fig. 1 The molecular phylogenetic tree of *S. curculusr* by NJ and ML method (numbers indicated bootstrap values of 1 000 replicates) based on CR+Cyt *b*



mv 1~14 表示理论分析出但没有实际观测到的单倍型;H_1~23 表示 23 个单倍型,圆圈面积表示单倍型分布的频率 mv 1-14 indicates 14 median vectors,H_1-23 indicate 23 haplotypes, size of circle denotes haplotype frequency.

图 2 23 个 mtDNA CR+Cyt b 单倍型的进化网络关系

Fig. 2 Median joining network of 23 mtDNA CR+Cyt b haplotypes

和11个单倍型,亚枝HapB包含了12个长江水系的个体和12个单倍型,各亚枝表现出明显的地理分布特征,与构建的2个个体的分子系统树基本一致。除H_6为珠江水系的2个个体所共有外,其他均为一个个体对应一个单倍型,单倍型呈现出明显的零散分布,各亚枝不存在高频率分布的优势单倍型。mv1~14为推测的但未检测到的单倍型,在代表珠江水系的亚枝A中分布较多。

3 讨论

部分线粒体基因,如:Cyt b、12S rRNA、16S rRNA、COI基因和CR区,已成为进化生物学和群体遗传学中重要的分子标记。一般认为,CR序列进化速率快,Cyt b序列进化速率适中,前者为非编码基因,主要与线粒体基因的调控有关,后者为蛋白质编码基因,两者互为补充,且都是研究群体遗传学常用的技术手段。线粒体序列的拼接组合是目前研究线粒体进化关系的常用手段^[8, 15-16],相比单基因而言,多基因组合拼接既避免了基于不同的基因标记得出不同的进化关系的可能性,也弥补了单基因信息量的不足。本研究采用两者的拼接组合序列来研究赤眼鳟的遗传变异,使得结论更客观真实地反映现实的遗传多样性状况。

本研究组合序列的单倍型检出率高达95.83%,且多态位点数(及比例)、简约信息位点数(及比例)相对其他研究^[6, 17-19],具有较高的碱基变异水平。赤眼鳟单倍型多样性(H)、核苷酸多样性(π)和平均核苷酸差异数($K \pm S_D$)分别为0.996 4、0.038 3和50.927 2,与相同技术对光唇裂腹鱼的研究结果^[6, 17-19]相比,赤眼鳟的 H 、 π 和 K 值——反映遗传多样性水平的3个重要参数,均相对较高,在一定程度上也能间接反映出赤眼鳟的遗传多样性状况^[20]。

物种遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件,遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关^[21-22]。加强对现有资源的科学管理和保护、恢复有效种群大小、丰富遗传多样性是保护赤眼鳟自然资源的有效举措。由于赤眼鳟的过渡捕捞及环境破坏,其种群数量急剧下降、栖息范围缩小,导致其遗传多样性降低,而同一水系内,有限的群体数量和基因库导致近交频繁发生又加剧了遗传多样性的降低,依此恶性循环,导致同一水系内群体间的遗传变异和遗传多样性并不十分丰富,但珠江和长江水系间存在明显的遗传变异。分子变异分析

(AMOVA)结果也显示,4个群体总的遗传分化指数 $F_{ST}=0.817 6(P=0.000 0<0.05)$,表明群体间存在着显著性遗传差异,群体内的遗传变异对总的遗传变异贡献较小,仅18.24%,群体间的遗传变异为81.76%,对总的遗传变异贡献较大。

相同条件下定居性鱼类群体间的遗传分化和遗传变异一般较洄游性鱼类偏高。例如:洄游性鱼类的圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)和铜鱼(*Coreius heterodon*)^[23],其mtDNA序列和微卫星数据均显示其长江水系各群体间遗传距离均很小,群体间均未出现显著性遗传分化。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)作为半洄游性的四大家鱼之一,其微卫星和线粒体DNA研究结果^[24-26]也表明长江水系的草鱼只有一个“长江群体”,未出现遗传分化。赤眼鳟属于江湖半洄游性鱼类,在江河流水中产漂流性卵,随流水漂流孵化,鱼卵和初孵仔鱼在漂流过程中发育^[27-28]。本研究中,珠江水系的新丰和梧州水域分别代表了西江和东江流域,长江水系的宜昌和武汉水域分属长江上游和中游,虽有三峡大坝相隔,但研究表明,同一水系内群体间的遗传分化不明显,系统树显示两大水系内的不同水域混杂在一起,同为“长江群体”或“珠江群体”。杨太有等^[29-30]对宿鸭湖、丹江口水库和青龙湖3个赤眼鳟群体的遗传多样性的分析结果也表明3个地理群体间遗传分化并不明显,也证实了本研究结论。

淡水鱼同种个体间线粒体遗传变异的峰值水平是10%^[4],本研究的24个赤眼鳟个体间的遗传变异率在0~7.43%之间,个体间的遗传变异水平均在此峰值内,且明显小于赤眼鳟与外群青鱼间的遗传变异率(14.04%~14.69%)。说明,两大水系群体间虽然遗传分化较大,但从目前的研究结果看还未达到种或亚种的分化水平,仍然属于一个种。基于赤眼鳟CR+Cyt b组合序列,群体间的平均遗传距离、 F_{ST} 分析和AMOVA分析结果均表明,两水系赤眼鳟群体间有显著的遗传分化,存在显著的系统地理格局,分子系统树和单倍型网络关系图也支持了上述观点。分析其原因,从地理位置和气候来看,珠江属热带海洋性气候,长江属温带季风气候,南北气候相差较大,且长江和珠江生态环境也存在较大差异;不同水系赤眼鳟繁殖季节和产卵区域也存在明显差异。这些均直接导致了地理隔离和生殖隔离,也未曾有跨水系的引种记录,故种群间基因交流的可能几乎不存在,所以在不同水系形成遗传性能

上互有差异的孟德尔繁育群体,两者明显属于相互独立的地理群体,即“长江群体”和“珠江群体”^[20]。

在资源调查和采样过程中,发现自然水域中野生赤眼鳟很稀缺,野生种群大样本的采集存在一定困难,供本研究分析的样本数还较少,有必要在今后采集较大样本来检验和验证以上结论。

参 考 文 献

- [1] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展[J]. 遗传学报,2004,31(9):983-1000.
- [2] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-391.
- [3] LEE W J, KOCHER T D. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization [J]. *Genetics*, 1996, 139: 873-887.
- [4] MOMMSEN T P, HOCHACHKA P. Biochemistry and molecular biology of fishes [M]. London: Elsevier Science Publishers, 1993: 1-38.
- [5] XIAO W H, ZHANG Y P, LIU H. Molecular systematics of Xenocyprinae (Telestei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in east Asia [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 18: 163-173.
- [6] 韩虎峰,代应贵. 珠江水系光唇裂腹鱼可渡河种群 mtDNA D-loop 序列多态性分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 143-149.
- [7] SAMBROOK J, RUSSELL D. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京: 科学出版社, 1996: 464-469.
- [8] TANG Q Y, LIU H Z, MAYDEN R, et al. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39: 347-357.
- [9] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [10] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2005(1): 47-50.
- [11] WRIGHTS. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating [J]. *Evolution*, 1965, 19: 395-420.
- [12] 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: 479-497.
- [13] NEI M. Evolution of human races at the gene level [M] // BONNE T B, COHEN T, GOODMAN R M, et al. Human genetics, part A: the unfolding genome. New York: Alan R Liss, 1982: 167-181.
- [14] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] ZVYCHAĬNAIA E, DANIKIN A A, KHOLODOVA M V, et al. Analysis of the variability of the control region and cytochrome *b* gene of mtDNA of *Capreolus pygargus* [J]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 2011, 5: 511-517.
- [16] MASAFUMI M, ATSUSHI T, TERUTAKE H, et al. Phylogenetic relationships and phylogeography of *Hynobius tokyoensis* (Amphibia: Caudata) using complete sequences of cytochrome *b* and control region genes of mitochondrial DNA [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 44(1): 204-216.
- [17] 李娜,陈少波,谢起浪,等. 闽浙地区香鱼线粒体 Cyt *b* 基因和 D-loop 区序列多态性分析[J]. 遗传, 2008, 30(7): 919-925.
- [18] 彭士明,施兆鸿,陈超,等. 根据 mtDNA D-loop 序列分析东海银鲳群体遗传多样性[J]. 海洋科学, 2010, 34(2): 28-32.
- [19] 蒙子宁,杨丽萍,吴丰,等. 斜带石斑鱼、赤点石斑鱼 RAPD 和线粒体 Cyt *b* 基因序列变异分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 75-80.
- [20] CONRAD M. Adaptability: the significance of variability from molecular to ecosystem [M]. New York: Plenum Press, 1983.
- [21] FERAL J P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 268: 121-145.
- [22] LIAO X L, YU X M, TONG J. Genetic diversity of common carp from two largest Chinese lakes and the Yangtze River revealed by microsatellite markers [J]. *Hydrobiologia*, 2006, 568: 445-453.
- [23] LIAO X L, ZHU B, YU X M, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, brass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(2): 393-395.
- [24] 李思发,吕国庆,贝纳切兹. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学, 1998, 44(1): 82-93.
- [25] 张四明,汪登强,邓怀,等. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. 水生生物学, 2002, 26(2): 142-147.
- [26] LU G, LI S, BERNATCHEZ L. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conserve gene of four native carps within the Yangtze River, China [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatical Sciences*, 1997, 54: 47-58.
- [27] 陆奎贤. 珠江水系渔业资源 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 139.
- [28] 李捷,李新辉,谭细畅,等. 广东肇庆西江珍稀鱼类省级自然保护区鱼类多样性[J]. 湖泊科学, 2009, 21(4): 556-562.

- [29] 杨太有,关建义,陈宏喜.三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析[J].水生生物学报,2008,32(4):529-533.
- [30] 杨太有,关建义,陈宏喜,等.三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 RAPD 分析[J].四川动物,2008,27(5):783-784.

Evaluation of genetic diversity by using mitochondrial DNA control region and cytochrome *b* gene for *Squaliobarbus curriculus* in Yangtze River and Pearl River

YANG Hui-rong¹ LIU Li¹ GONG Shi-yuan² ZHAO Hui-hong¹ SUN Ji-jia¹ CHEN Yan-zhen¹

1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The mitochondrial CR and Cyt *b* gene segments of 24 *Squaliobarbus curriculus* from Yangtze River and Pearl River were amplified by PCR technique and sequenced. Analysis of the 1 345 bp combined mtDNA CR and Cyt *b* gene sequence showed that there were 23 haplotypes, 22 single-base mutation and 102 parsimony-informative sites. In the 139 variable sites, there were 100 transition sites, 30 transversion sites and 14 insertion/deletion sites. The content of A+T (61.5%) was much higher than that of C+G (38.5%). The genetic variation among the 4 populations ranged from 0 to 7.43%. The haplotype diversity (H), mean number of pair-wise differences ($K \pm S_D$) and nucleotide diversity (π) were 0.977 8, 17.271 0 and 0.002 7, respectively, suggesting high genetic diversity. There were significant genetic differences of F_{ST} values between Yangtze River and Pearl River, but there were no genetic differences within the same river. The result of molecular phylogenetic tree constructed by NJ and ML methods and median joining network of 23 haplotypes also supported that point. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic differentiation among four populations was caused by genetic variation between Yangtze River and Pearl River and no genetic differentiation existed between populations within the same river, which further supported the F_{ST} result. The obvious genetic differentiation was mainly attributed to the reproductive isolation caused by the geographical isolation between Yangtze River and Pearl River. But, in the same river system, there was no genetic differentiation between different populations because of wide genetic communication caused by the "semi-immigrations" behavior of *S. curriculus*.

Key words *Squaliobarbus curriculus*; mitochondrial DNA; control region; cytochrome *b* gene; genetic diversity; Yangtze River; Pearl River

(责任编辑:边书京)