

# 同域分布二倍体和四倍体泥鳅群体的遗传结构

周玲玲<sup>1</sup> 张桂蓉<sup>1</sup> 魏开建<sup>1</sup> 邹桂伟<sup>2</sup> 王卫民<sup>1</sup> 梁宏伟<sup>2</sup> 冉玮<sup>1</sup>

1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所/农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 武汉 430060

**摘要** 采用 SRAP 标记和线粒体 DNA 控制区测序方法对武汉和洞庭湖 2 个二倍体和四倍体泥鳅同域分布区 4 个泥鳅群体的遗传结构进行研究。SRAP 分析结果表明, 18 对多态性引物组合在 4 个泥鳅群体中共检测到 534 个位点, 每对引物组合检测的位点数为 23~40 个; 各群体的 Nei's 基因多样性( $h$ ) 和 Shannon's 信息指数( $I$ ) 平均值分别为 0.205~0.218 和 0.324~0.341, 4 个群体间的  $h$  以及  $I$  差异不明显; 基于 Nei's 无偏遗传距离构建的 UPGMA 树显示, 洞庭湖二倍体和四倍体泥鳅群体亲缘关系最近, 先聚为一支, 再与武汉四倍体泥鳅聚为一支, 而武汉二倍体泥鳅聚为单独一支。测定了 4 个泥鳅群体 40 个个体线粒体 DNA 控制区序列片段(932~935 bp), 发现 47 个变异位点, 共计 29 种单倍型。洞庭湖四倍体和二倍体泥鳅群体的核苷酸多样性( $\pi$ ) 分别为 0.898% 和 0.872%, 明显大于武汉四倍体( $\pi=0.465%$ ) 和二倍体( $\pi=0.675%$ )。在同域分布二倍体和四倍体泥鳅群体中, 洞庭湖四倍体遗传多样性略大于洞庭湖二倍体, 武汉二倍体则明显大于武汉四倍体。AMOVA 分析表明, 泥鳅群体的遗传变异主要来自群体内(62.68%), 群体间的变异达到 37.32%; 群体间成对固定指数  $F_{ST}$  及 Kimura 2-parameter 遗传距离均显示, 洞庭湖四倍体与二倍体泥鳅群体无明显分化, 其余群体间均存在显著分化。控制区序列单倍型 Bayesian 系统树与 SRAP 分析所揭示的 4 个泥鳅群体的亲缘关系相似。

**关键词** 泥鳅; 相关序列扩增多态性; 线粒体 DNA 控制区; 倍性; 遗传变异; 单倍型

**中图分类号** S 917; Q 347 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0624-07

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 是鳅科 (Cobitidae) 的小型淡水鱼类, 是我国重要养殖对象和出口创汇品种。我国的泥鳅主要为天然二倍体和四倍体<sup>[1]</sup> 以及极少量天然三倍体和六倍体泥鳅<sup>[2-3]</sup>。探讨不同倍性泥鳅的分布格局以及倍性之间的遗传关系, 对于阐明泥鳅多倍体形成机制, 保护及合理利用泥鳅种质资源具有非常重要的意义。日本对泥鳅的倍性<sup>[4-5]</sup>、群体遗传多样性<sup>[6-7]</sup> 和微卫星遗传图谱<sup>[8]</sup> 等做了较多研究。近年来国内采用 RAPD 和 SSR 标记对泥鳅部分群体的遗传变异进行了研究<sup>[9-11]</sup>, 但对不同倍性泥鳅之间遗传关系的报道极少<sup>[12]</sup>。

相关序列扩增多态性 (SRAP) 是一种新型的旨在扩增开放阅读框 (ORFs) 的分子标记技术<sup>[13]</sup>, 具有稳定、多态性丰富、高共显性、适用性广等特点, 广泛应用于植物的遗传多样性分析等研究<sup>[14-15]</sup>, 近年

来在鱼、虾遗传结构分析方面得到应用<sup>[16-18]</sup>。线粒体 DNA (mtDNA) 具有结构简单、母系遗传、进化速度快等特点, 是群体遗传学和系统进化研究的重要标记<sup>[19]</sup>, 其中控制区 (D-Loop 区) 是线粒体基因组中进化速度最快、变异最大的非编码区, 广泛应用于鱼类种群遗传结构和遗传多样性研究<sup>[20-21]</sup>, 但未见 SRAP 标记和 mtDNA 控制区序列应用于泥鳅及其不同倍性群体遗传研究的报道。

笔者采用 SRAP 标记和 mtDNA 控制区序列分析方法对湖北省武汉市和湖南省岳阳洞庭湖区 2 个二倍体和四倍体泥鳅同域分布区内 4 个泥鳅群体的遗传结构和亲缘关系进行分析, 旨在为探讨不同倍性泥鳅的亲缘地理学格局和系统进化提供遗传学依据, 也为我国泥鳅种质资源保护和合理利用提供基础资料。

收稿日期: 2011-03-01

基金项目: 国家科技基础条件平台专项 (2006DKA30470-002); 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室开放课题 (LFBCU0708)

周玲玲, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: thorpehonger1010@163.com

通讯作者: 魏开建, 博士, 副教授, 研究方向: 水产动物遗传育种. E-mail: kjwei@mail.hzau.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 样本采集与 DNA 提取

2007年在湖北省武汉市蔡甸区和湖南省岳阳市洞庭湖区共采集泥鳅样本127尾。泥鳅活体运回实验室,分别采集血液样品,预处理后经流式细胞仪检测个体的倍性,其中武汉二倍体(WHD)36尾、武汉四倍体(WHT)36尾、洞庭湖二倍体(DTD)18尾、洞庭湖四倍体(DTT)37尾,全部样本用95%乙醇固定。采用常规酚-氯仿抽提法从尾鳍组织中提取基因组DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,核酸蛋白检测仪测定DNA浓度。

## 1.2 PCR 扩增和遗传分析

1)SRAP 扩增和电泳。根据文献报道 SRAP 标记引物<sup>[13]</sup>合成8个正向、11个反向引物<sup>[18]</sup>。将正向、反向引物配对形成88个引物组合,以泥鳅混合DNA池为模板进行SRAP-PCR扩增,筛选出条带清晰、稳定的多态性引物组合。PCR反应在PTC-200热循环仪(MJ Research)上进行,PCR反应体系和循环参数同文献<sup>[18]</sup>。PCR产物经6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、银染,Bio-Rad凝胶成像系统照相。

2)mtDNA 控制区序列扩增和测序。各泥鳅群体分别随机抽取9~13个个体测定其mtDNA控制区序列。mtDNA控制区扩增引物为DL1(5'-AC-CCCTGGCTCCCAAAGC-3')和DH2(5'-ATCT-TAGCATCTTCAGTG-3')<sup>[22]</sup>。PCR反应体系为50 μL:包括模板DNA 100 ng,10×PCR buffer 5.0 μL,1.6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.25 mmol/L dNTPs,2 U Taq DNA 酶(Fermentas),引物各0.5 μmol/L,用灭菌双蒸水补足50 μL。PCR循环参数为:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s,35个循环;然后72℃延伸10 min,4℃保温。PCR扩增产物纯化后送上海生工生物工程有限公司正反测序。

## 1.3 统计分析

1)SRAP 分析。根据SRAP电泳图谱,参照100 bp DNA Ladder,将每1条清晰扩增条带视为1个位点,对每个个体SRAP扩增带的有无进行统计,有记为“1”,无记为“0”,将电泳图谱转换成数字矩阵。采用POPGENE 1.32软件计算泥鳅各群体的Shannon's 信息指数( $I$ )、Nei's 基因多样性( $h$ ),

统计不同引物组合对各群体的扩增位点数( $B$ )和多态位点数( $N$ ),计算多态位点百分率( $P$ )、群体间Nei's无偏遗传距离( $D$ )和遗传相似度( $S$ )。根据Nei's无偏遗传距离用MEGA 4.0软件构建4个群体的UPGMA聚类图。

2)mtDNA 控制区序列分析。采用Clustal X 1.8软件进行DNA序列比对。用MEGA 4.0分析序列的碱基组成和变异位点等特征,根据Kimura 2-parameter模型计算群体间平均遗传距离。用DnaSP 5.10.0软件分析DNA序列单倍型并输出变异位点,计算单倍型多样性( $H_d$ )、核苷酸多样性( $\pi$ )和遗传分化系数( $G_{ST}$ )。采用ARLEQUIN 3.11软件对群体内和群体间单倍型的遗传变异进行AMOVA分析;计算群体间的成对固定指数 $F_{ST}$ ,对其 $P$ 值作连续性Bonferroni校正后进行多重比较。

利用MRBAYES 3.1.2软件构建泥鳅DNA序列单倍型的贝叶斯(Bayesian)系统发育树,以大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*) mtDNA控制区序列(GenBank no. AY017145)为外类群。基于MODELTEST 3.7软件分析,选用TIM+I+G模型用于MRBAYES分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 SRAP 扩增多态性及群体遗传多样性

从88个SRAP引物组合中筛选出18个多态引物组合(me1-em2, me1-em3, me4-em1, me4-em2, me4-em3, me4-em4, me4-em7, me4-em10, me5-em5, me5-em9, me6-em1, me6-em8, me6-em10, me7-em1, me7-em5, me7-em10, me8-em3, me8-em10)用于泥鳅群体SRAP分析。18个引物组合在泥鳅4个群体中共检测到534个位点,每个引物组合检测到23~40个位点(平均约30个位点)。各群体SRAP扩增多态位点数( $N$ )和多态位点百分率( $P$ )的变化范围分别为419~456和78.46%~85.39%(表1)。

采用Nei's 基因多样性( $h$ )和Shannon's 信息指数( $I$ )度量各群体的遗传多样性, $h$ 和 $I$ 的平均值大小分别为0.205~0.218和0.324~0.341,其中WHD群体 $h$ 和 $I$ 最大,DTD群体最小。同域分布群体相比较,WHD的 $h$ 值和 $I$ 值略高于WHT,DTT的 $h$ 值和 $I$ 值略高于DTD,但4个群体间 $h$ 值或 $I$ 值差异不显著( $P>0.05$ )。

表 1 泥鳅 4 个群体 SRAP 扩增多态位点数、多态位点百分率及遗传多样性参数<sup>1)</sup>Table 1 Number of polymorphic loci, percent of polymorphic loci of SRAP amplification and genetic diversity parameters for four populations of *Misgurnus anguillicaudatus*

参数 Parameter	群体 Population			
	WHD ( $n=36$ )	WHT ( $n=36$ )	DTD ( $n=18$ )	DTT ( $n=37$ )
多态位点数( $N$ ) Number of polymorphic loci	432	440	419	456
多态位点百分率( $P$ )/% Percent of polymorphic loci	80.90	82.40	78.46	85.39
Nei's 基因多样性( $h$ ) Nei's gene diversity	0.218±0.171	0.209±0.172	0.205±0.171	0.213±0.159
Shannon's 信息指数( $I$ ) Shannon's information index	0.341±0.239	0.329±0.239	0.324±0.239	0.340±0.221

1) WHD: 武汉二倍体 Wuhan diploid; WHT: 武汉四倍体 Wuhan tetraploid; DTD: 洞庭湖二倍体 Dongting diploid; DTT: 洞庭湖四倍体 Dongting tetraploid;  $n$ : 样本容量 Sample size.

## 2.2 基于 SRAP 标记的群体间遗传距离和亲缘关系

根据 SRAP 扩增数据计算出泥鳅 4 个群体间 Nei's 无偏遗传距离( $D$ )和遗传相似度( $S$ )见表 2。DTT 和 DTD 间遗传距离最小(0.050), DTT 和 WHD 间遗传距离最大(0.082)。基于  $D$  构建泥鳅 4 个群体的 UPGMA 树(图 1), 各分支上的数值为支长。DTT 和 DTD 群体亲缘关系最近, 先聚为一支, 再与 WHT 群体聚为一支; WHD 群体聚为单独的一支。

表 2 基于 SRAP 标记的泥鳅群体间 Nei's 无偏遗传距离(对角线下)和遗传相似度(对角线上)

Table 2 Nei's unbiased genetic distance(below diagonal) and genetic similarity (above diagonal) among populations of *Misgurnus anguillicaudatus* based on SRAP marker

种群 Population	WHD	WHT	DTD	DTT
WHD	—	0.931	0.925	0.921
WHT	0.071	—	0.940	0.932
DTD	0.078	0.062	—	0.951
DTT	0.082	0.070	0.050	—

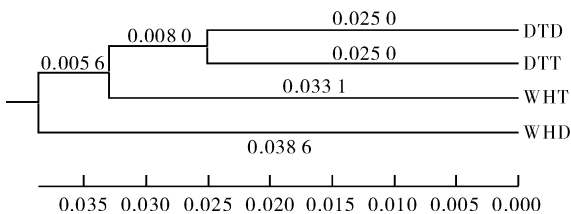


图 1 基于 Nei's 无偏遗传距离构建的泥鳅 4 个群体的 UPGMA 树

Fig. 1 UPGMA dendrogram based on Nei's unbiased genetic distance for four populations of *Misgurnus anguillicaudatus*

## 2.3 mtDNA 序列特征和群体遗传多样性

经测定, 泥鳅 40 个个体 mtDNA 控制区部分序列片段长度为 932~935 bp。经序列比对, 在 935 个位点中, 有 47 个变异位点, 其中有 8 个单突变位点, 34 个简约性位点, 5 个插入/缺失位点, 平均转换/颠换比( $T_s/T_v$ )为 2.4。序列的 A、T、C、G 平均含量分别为 33.68%、31.88%、20.07% 和 14.43%, A+T 含量(65.56%)明显高于 C+G 含量(34.50%), 表现出明显的反 G 偏倚特点。

40 个序列共检测到 29 种单倍型(H1~H29) (GenBank 号为 HQ014453 ~ HQ014478, HQ891547~HQ891549), 泥鳅群体间不存在共享的单倍型, 各群体的单倍型数见表 3。群体的单倍型多样性( $H_d$ )大小为 0.859 (DDT)~0.972 (WHD), 核苷酸多样性( $\pi$ )为 0.465% (WHT)~0.898% (DDT), 各群体的核苷酸多样性与单倍型多样性大小不成正比关系。DTT 的  $\pi$  值略大于 DTD ( $P>0.05$ ), WHD 的  $\pi$  值明显大于 WHT ( $P<0.05$ ), 而 DTT 和 DTD 的  $\pi$  值均明显大于 WHD 和 WHT ( $P<0.05$ )。

表 3 泥鳅不同群体 mtDNA 控制区序列单倍型数( $H$ )及单倍型多样性( $H_d$ )和核苷酸多样性( $\pi$ )<sup>1)</sup>

Table 3 The number of haplotypes ( $H$ ), haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) within population for mtDNA control region sequence of *Misgurnus anguillicaudatus*

群体 Population	$H$	$H_d$	$\pi$ /%
WHD( $n=9$ )	8	0.972±0.064	0.675±0.087
WHT( $n=9$ )	7	0.889±0.091	0.465±0.061
DTD( $n=9$ )	8	0.917±0.092	0.872±0.088
DTT( $n=13$ )	6	0.859±0.063	0.898±0.124

1)  $n$ : 样本容量 Sample size;  $H$ : 单倍型数 Number of haplotypes;  $H_d$ : 单倍型多样性 Haplotype diversity;  $\pi$ : 核苷酸多样性 Nucleotide diversity.

### 2.4 基于 mtDNA 序列的群体遗传结构

根据 mtDNA 控制区序列和 Kimura 2-parameter 模型计算出泥鳅群体间的平均 K<sub>2-p</sub> 遗传距离为 0.011~0.015, DTT 与 DTD 群体间遗传距离最小, 而 WHT 与 WHD 群体间的遗传距离较大(表 4)。

表 4 泥鳅群体间平均 K<sub>2-p</sub> 遗传距离(对角线下)和成对固定指数  $F_{ST}$  (对角线上)<sup>1)</sup>

Table 4 Average K<sub>2-P</sub> distance(below diagonal) and pairwise fixation index  $F_{ST}$  values (above diagonal) between populations of *Misgurnus anguillicaudatus*

群体 Population	WHD	WHT	DTD	DTT
WHD	—	0.555 *	0.297 *	0.333 *
WHT	0.014	—	0.409 *	0.484 *
DTD	0.012	0.012	—	0.149
DTT	0.013	0.015	0.011	—

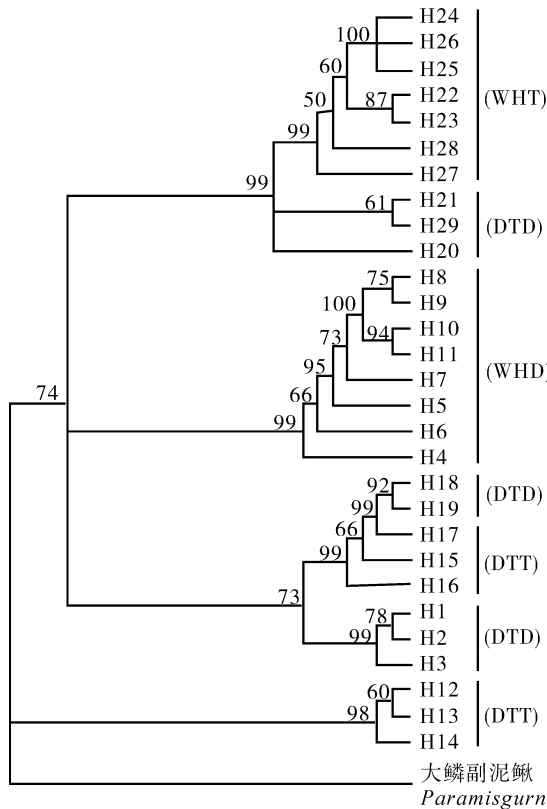
1) \* 表示经连续性 Bonferroni 校正后显著( $\alpha=0.05$ ) Indicates significance after sequential Bonferroni correction ( $\alpha=0.05$ ).

除 DDT 与 DTD 群体间成对固定指数  $F_{ST}$  不显著外( $P>0.05$ ), 群体间其余  $F_{ST}$  均显著( $P<0.05$ ), 表明群体间存在较大的遗传差异, 其中 WHD 和 WHD 间的遗传差异最大( $F_{ST}=0.555$ )。计算出泥鳅 4 个群体间的遗传分化系数( $G_{ST}$ )为 0.157。

AMOVA 分析表明, 泥鳅 4 个群体的遗传变异主要来自群体内(62.68%), 群体间的变异占 37.32%, 且群体间存在极显著分化( $F_{ST}=0.3732$ ,  $P<0.001$ )。当按照倍性将泥鳅划分为二倍体(WHD+DTD)和四倍体(WHT+DTT)2 个倍性组, 以及根据地理位置将泥鳅划分为武汉(WHT+WHD)和洞庭湖(DTT+DTD)2 个地理组分别进行 AMOVA 分析时, 均显示泥鳅群体的遗传变异主要发生在群体内, 不同倍性组群间或不同地理组群间均无显著的遗传分化( $P>0.05$ )。

### 2.5 mtDNA 序列单倍型系统发育关系

泥鳅 mtDNA 控制区序列单倍型的贝叶斯(Bayesian)系统发育树如图 2 所示。4 个群体的单



H1~H29 为单倍型代码; 节点上的数值表示后验概率(>50%); 括号内为各单倍型所属的群体。H1-H29 represent haplotype codes; numbers above the nodes are the calculated posterior probabilities (>50%); the population(s) where each haplotype occurred are in brackets.

图 2 泥鳅 4 个群体控制区序列单倍型的贝叶斯 50% 多数一致性树

Fig. 2 A 50% majority-rule consensus tree created through Bayesian inference constructed from the control region sequence haplotypes for four populations of *Misgurnus anguillicaudatus*



倍型并没有完全按照倍性或者地理位置形成对应的组群。WHD 的单倍型聚为单独的一支；WHT 的单倍型聚在一起并与 3 个 DTD 单倍型聚为一支；DTD 其余单倍型与 3 个 DTT 单倍型聚为一支；DTT 其余 3 个单倍型聚为一支并位于系统树的基部。

### 3 讨论

#### 3.1 不同倍性泥鳅群体的遗传多样性

SRAP 分析显示, 泥鳅群体均显示出较高的 SRAP 扩增多态性, SRAP 多态引物组合扩增出的平均多态性标记数(30 个/组合)为 SSR 引物检测结果(5.3 个/对)<sup>[11]</sup>的 5.66 倍, 说明 SRAP 标记比 SSR 标记能扩增出更加丰富的多态性标记, 适用于群体遗传多样性分析。4 个泥鳅群体的 SRAP 多态位点百分率( $P$ )、Nei's 基因多样性( $h$ )和 Shannon's 信息指数( $I$ )均明显大于鄱阳湖、梁子湖和淤泥湖团头鲂群体的相应参数<sup>[18]</sup>, 说明泥鳅群体具有较高的遗传多样性, 这与其人工养殖历史较短, 野生资源受人工繁育等活动影响较小有关。

从泥鳅 40 个个体 mtDNA 控制区序列中检出 29 种单倍型, 说明泥鳅 4 个群体存在丰富的 mtDNA 多态性; 虽然各群体的单倍型多样性( $H_d$ )较高, 但各群体的核苷酸多样性( $\pi$ )显著低于群体单倍型多样性, 说明泥鳅群体虽然积累了较高的单倍型多样性, 但积累的核苷酸序列多样性还很低, 暗示泥鳅群体可能经历过种群的快速增长, 这与黄河裸裂尻鱼不同种群 mtDNA 控制区序列特征相似<sup>[21]</sup>。DTT 群体的  $\pi$  值略大于 DTD, WHD 的  $\pi$  值显著大于 WHT, 这与 SRAP 分析中同域泥鳅群体遗传多样性大小次序相吻合; 而 DTT 和 DTD 的  $\pi$  值又显著大于 WHD 和 WHT, 说明洞庭湖 2 个群体的遗传多样性水平较高。此外, 4 个泥鳅群体核苷酸多样性平均值(0.728%)与青藏高原特有鱼类黄河裸裂尻鱼不同种群平均值(0.762%)<sup>[21]</sup>相当, 显示泥鳅群体具有较高遗传多样性。

对长江中下游 4 个泥鳅群体的 SSR 分析表明, 洞庭湖二倍体泥鳅的遗传多样性大于武汉二倍体<sup>[11]</sup>, 与本研究 mtDNA 序列分析一致, 但与 SRAP 分析中两者的大小关系相反, 这表明不同分子标记对群体遗传变异的度量尺度不同。SSR 标记分布于整个基因组, 可以揭示整个核基因组的多

样性; 而 SRAP 标记的扩增区域为开放阅读框(ORF), 是核基因组中更加保守的功能区域, 不同品种、群体或个体之间基因组功能区域的遗传差异小于基因组其他区域, 因此, SRAP 标记揭示的 4 个泥鳅群体的遗传多样性差异不显著, 说明泥鳅群体间基因组功能区域的遗传差异不显著, 其中 DTD 和 WHD 群体间的遗传多样性差异小于 SSR 标记分析结果。mtDNA 控制区是线粒体基因组中变异最大的非编码区, 进化速度高于核基因组, 因而基于 mtDNA 序列得出泥鳅群体间的遗传多样性差异大于 SRAP 标记分析结果。mtDNA 控制区序列分析表明 DTD 群体遗传多样性大于 WHD, 并与 SSR 分析结果<sup>[11]</sup>及 mtDNA *ND-5/6* 基因 RFLP 分析结果(待发表)一致, 揭示洞庭湖二倍体泥鳅比武汉二倍体具有更高的遗传变异。

#### 3.2 不同倍性泥鳅群体遗传分化

遗传分化系数( $G_{ST}$ )是度量群体间遗传分化的重要参数。一般地, 当  $G_{ST}$  为 0.15~0.25 时群体间有较大遗传分化<sup>[11]</sup>, 而本研究中 4 个泥鳅群体间  $G_{ST}$  为 0.157, 略高于 0.15, 说明群体间存在较大遗传分化, 这与 AMOVA 分析结果相吻合。等位酶分析表明日本产泥鳅种群间的遗传分化程度很高, 44 个种群间  $G_{ST}$  达到 0.774<sup>[6]</sup>, 这可能与等位酶分析的种群数量较多有关。本研究中, 除 DDT 与 DTD 群体间固定指数  $F_{ST}$  不显著( $P>0.05$ )外, 群体间其余  $F_{ST}$  均显著不等于 0( $P<0.05$ ), 说明这些群体间并非随机交配, 且存在较大遗传分化。这与泥鳅多栖息于稻田、水沟等浅水水域, 迁移活动范围较小有关。

群体之间的遗传距离( $D$ )反映了群体间遗传变异的大小和亲缘关系的远近。SRAP 分析结果显示, WHD 和 DTD 2 个泥鳅群体间遗传距离为 0.078, 明显小于 SSR 标记分析得出的 2 个群体间遗传距离(0.157)<sup>[11]</sup>, 说明 SSR 标记揭示的泥鳅野生群体遗传距离大于 SRAP 标记分析结果, 这与陈伦林等<sup>[15]</sup>对甘蓝型油菜的研究结果一致。

SRAP 和 mtDNA 序列分析表明, 洞庭湖 DTD 和 DTT 群体间的遗传距离最小, WHD 与 WHT、DTT 之间的遗传距离较大。聚类分析表明, DTT 和 DTD 群体亲缘关系最近先聚为一支, 再与 WHT 群体聚为一支, 而 WHD 群体单独成为一支。mtDNA 序列贝叶斯分析表明, DTD 与 DTT 多个单倍

型混在一起形成复系,说明 DTT 和 DTD 亲缘关系较近;WHT 的单倍型先聚为单系再与 3 个 DTD 单倍型形成并系;WHD 的单倍型形成单系;4 个群体的单倍型并没有完全按照倍性或者地理位置形成对应的组群,这与 AMOVA 分析揭示的不同倍性组群间或不同地理组群间没有显著遗传分化一致,说明从武汉和洞庭湖 2 个不同倍性同域分布区采集的泥鳅没有倍性之间的明显分化,也没有明显的地理分化。mtDNA *cyt b* 序列分析表明,湖北省内二倍体和四倍体泥鳅之间遗传分化显著,且相同倍性群体间遗传变异不显著<sup>[12]</sup>,这反映出不同分布区的泥鳅可能存在不同程度的遗传变异。从本研究 4 个泥鳅群体的聚类关系和贝叶斯系统发育关系可以看出,洞庭湖和武汉的四倍体泥鳅都与洞庭湖二倍体存在较近的亲缘关系,而武汉二倍体是一个与其他群体间分化较大的独特群体。要阐明我国不同倍性泥鳅间的亲缘地理学格局以及多倍体的形成机制,有待对更大范围的样本作进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 印杰,赵振山,陈小奇,等. 二倍体和四倍体泥鳅染色体组型比较[J]. 水生生物学报,2005,29(4):469-472.
- [2] 李雅娟,田萍萍,李莹,等. 中国洪湖不同倍性泥鳅的染色体组型及形态特征比较分析[J]. 大连水产学院学报,2009,24(3):236-241.
- [3] ABBAS K, LI M Y, WANG W M, et al. First record of the natural occurrence of hexaploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in Hubei Province, China [J]. Journal of Fish Biology, 2009, 75:435-441.
- [4] ARAI K, MATSUBARA K, SUZUKI R. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57:2167-2172.
- [5] ARAI K. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: recent progress and perspective [J]. Folia Biologica, 2003, 51:107-117.
- [6] KHAN M R, ARAI K. Allozyme variation and genetic differentiation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Fisheries Science, 2000, 66:211-222.
- [7] ARIAS R L, MORISHIMA K, ARAI K. Genetically diversified populations in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* inferred from newly developed microsatellite markers [J]. Molecular Ecology Notes, 2007(7):82-85.
- [8] MORISHIMA K, NAKAYAMA I, ARAI K. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) [J]. Genetica, 2008, 132:227-241.
- [9] 常重杰,周荣家,余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 动物学报,2001,47(1):89-93.
- [10] 曾柳根,甘云飞,王军花,等. 鄱阳湖区泥鳅的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 南昌大学学报:理科版,2008,32(1):84-88.
- [11] 单磊,魏开建,张桂蓉,等. 长江中下游二倍体泥鳅 4 个种群的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报,2009,28(4):453-458.
- [12] YANG C T, CAO L, WANG W M, et al. Comparative and evolutionary analysis in natural diploid and tetraploid weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* based on cytochrome b sequence data in central China [J]. Environmental Biology of Fishes, 2009, 86:145-153.
- [13] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103:455-461.
- [14] 林忠旭,张献龙,聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F<sub>2</sub> 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报,2004, 31(6):622-626.
- [15] 陈伦林,邹小云,李书宇,等. SSR 和 SRAP 标记揭示甘蓝型油菜遗传多样性的差异分析[J]. 分子植物育种,2008,6(3):511-516.
- [16] 周劲松,曹哲明,杨国梁,等. 罗氏沼虾缅甸引进种和浙江本地种及其杂交种的生长性能与 SRAP 分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4):667-673.
- [17] 张志伟,韩曜平,仲霞铭,等. 草鱼野生群体和人工繁殖群体遗传结构的比较研究[J]. 中国水产科学,2007,14(5):720-725.
- [18] 冉玮,张桂蓉,王卫民,等. 利用 SRAP 标记分析 3 个团头鲂群体的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报,2010,29(5):601-606.
- [19] 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):384-392.
- [20] GRUNWALD C, STABILE J, WALDMAN J R, et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. Molecular Ecology, 2002, 11:1885-1898.
- [21] 祁得林,晁燕,郭松长,等. 黄河裸裂尻鱼五种群 mtDNA 控制区的遗传结构[J]. 动物学报,2008,54(6):972-980.
- [22] LIU H Z, TZENG C S, TENG H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control regions and their implication for the phylogeny of the Cypriniformes [J]. Canadian Journal of Zoology, 2002, 80:569-581.

## Genetic structure of sympatric diploid and tetraploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) populations

ZHOU Ling-ling<sup>1</sup> ZHANG Gui-rong<sup>1</sup> WEI Kai-jian<sup>1</sup>  
ZOU Gui-wei<sup>2</sup> WANG Wei-min<sup>1</sup> LIANG Hong-wei<sup>2</sup> RAN Wei<sup>1</sup>

1. College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater  
Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization,  
Ministry of Agriculture/Yangtze River Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430060, China

**Abstract** SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) markers and mitochondrial DNA control region sequencing were used to investigate genetic structure of four loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) populations from two sympatric distribution areas of natural diploid and tetraploid loach—Dongting Lake (DT) and Wuhan city (WH) in China. The results from SRAP showed that a total of 534 loci were detected in four loach populations by 18 pairs of polymorphic primer combinations, and the numbers of amplified loci per primer pair ranged from 23 to 40. The averages of Nei's gene diversity ( $h$ ) and Shannon's information index ( $I$ ) of each population were from 0.205 to 0.218 and from 0.324 to 0.341, respectively, and there were no significant difference among  $h$ -values or  $I$ -values of four populations. UPGMA dendrogram tree, which was constructed based on the Nei's unbiased genetic distances, showed that DT diploid and DT tetraploid populations were firstly clustered into one branch and their relationships were the nearest, then WH tetraploid population was clustered to the branch. And the other branch contained only WH diploid population. Partial sequences of mitochondrial control region (932-935 bp) of 40 individuals representing four loach populations were sequenced. A total of 47 nucleotides were variable, resulting in a total of 29 haplotypes. Nucleotide diversities ( $\pi$ ) of DT tetraploid and DT diploid within populations were 0.898% and 0.872%, respectively, and they were significantly larger than those of WH tetraploid ( $\pi=0.465\%$ ) and WH diploid ( $\pi=0.675\%$ ). Within the sympatric diploid and tetraploid loach populations, genetic diversity of DT tetraploid was larger than that of DT diploid, and the genetic diversity of WH diploid was significantly larger than that of WH tetraploid. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the genetic variation mainly occurred within populations (63.55%), and 37.32% of variation occurred among populations. Significant population subdivision was supported by both pairwise  $F_{ST}$  values and Kimura 2-parameter genetic distances between populations, except for no apparent subdivision between DT tetraploid and DT diploid. Phylogenetic tree through Bayesian inference from the control region sequence haplotypes was similar to the genetic relationship among four loach populations revealed by SRAP analysis.

**Key words** *Misgurnus anguillicaudatus*; SRAP; mitochondrial DNA control region; ploidy; genetic variation; haplotype

(责任编辑:边书京)