

doi: 10.7541/2015.146

基于线粒体控制区的云南澜沧江和海南岛主要水系 宽额鳢遗传变异分析

薛丹 章群 郜星晨 官亚运 曹艳

(暨南大学水生生物研究中心, 广州 510632)

摘要: 为了解中国宽额鳢的遗传背景以更好地保护和开发利用资源, 测定了云南澜沧江和海南岛南渡江、万泉河与昌化江等 4 个水系 9 个群体 74 尾宽额鳢线粒体控制区 411 bp 序列, 发现 52 个变异位点和 20 个单倍型; 在系统树上可分为云南、海南毛阳群体和海南其他群体等 3 个分支。谱系间 F_{st} 为 0.786—0.672 ($P < 0.01$), 基因流 N_m 为 0.153—0.244; 74.352% 的变异来自谱系间, 谱系间分化时间为 2.070—0.350 Ma。推测海南与云南宽额鳢分化可能受云贵高原隆起和海南岛与陆地分离等地质事件影响; 海南 2 个谱系的形成则可能是受到了五指山脉隆起的影响。云南组群与海南组群间 F_{st} 为 0.765 ($P < 0.01$), 基因流 N_m 为 0.149, 70.360% 的变异来自不同地理组群间, 表明云南组群和海南组群间高度分化。相比同区域分布的鱼类, 宽额鳢总体的单倍型多样性和核苷酸多样性均较高 ($H_d = 0.903 \pm 0.016$, $\pi = 0.036 \pm 0.003$), 其中海南琼中和石壁群体的核苷酸多样性 (π) 最高均为 0.008; 云南勐腊群体最低为 0.000; 但各个地理群体均比总体的遗传多样性低, 可能是后者由多个谱系叠加所致。在简约性网络图中单倍型呈非典型星状分布, 中性检验为非显著负值和核苷酸不配对分析呈现多峰分布, 表明宽额鳢群体历史上较为稳定, 没有出现显著种群扩张。

关键词: 宽额鳢; 澜沧江; 海南岛; 线粒体控制区; 遗传变异

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)06-1107-10

宽额鳢 (*Channa gachus*) 俗称南鳢或白边鳢, 隶属鲈形目 (Perciformes) 鳢科 (Channidae) 鳢属, 为热带、亚热带水流缓慢的河流、河沟及池塘中分布的肉食性淡水鱼类^[1]。国外主要分布在阿富汗、尼泊尔、印度次大陆、东南亚各国^[1]。宽额鳢在中国主要分布在云南伊洛瓦底江、怒江、澜沧江以及海南各水系等^[1]。《广西淡水鱼类志》第一版 (1981 年) 记载在南宁水塘口采到的 1 尾标本^[2], 第二版 (2006 年) 中没有新的采样记录^[3]。潘炯华等^[4, 5]在 1984 年《广东北江鱼类区系研究》和 1987 年《珠江水系北江渔业资源》中关于鱼类名录的列表显示广东北江水系的宽额鳢数量多分布广, 但他在 1991 年主编的《广东淡水鱼类志》^[6]中关于宽额鳢的分布却只提及海南岛各水系而再无广东省。随后郑慈英 (1989) 编著

的《珠江鱼类志》^[7]、李捷等 2007 年^[8]和 2009 年^[9]分别开展的广东连江和肇庆鱼类资源调查, 李桂峰^[10]2013 年编著的《广东淡水鱼类资源调查与研究》, 林小涛和张洁^[11]2013 年编著的《东江鱼类生态及原色图谱》, 本课题组对珠江流域历史文献报道产地的多次调查, 都没有发现宽额鳢。宽额鳢对环境的适应性强, 可离水长时间生存, 近 50 年来广西没有再报道, 近 25 年来广东也再无发现, 表明在广西和广东的地理分布存疑或虽有分布但相当罕见。宽额鳢生长较慢, 肉味鲜美, 是产地常见经济鱼类^[1]; 近年来因个体较小 (体长一般不超过 20 cm) 而颜色鲜艳, 逐渐成为观赏鱼^[12]。随着日趋严重的江河污染, 水利设施的兴建和酷渔滥捕, 云南和海南淡水鱼类数量急剧减少, 不少种类出现衰退^[13, 14], 亟待采取

收稿日期: 2014-10-20; 修订日期: 2015-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41071034); 中央高校基本科研业务费专项资金 (21613105); 欧盟 Erasmus Mundus TECHNO I 博士后交流项目资助

作者简介: 薛丹 (1989—), 女, 广东潮州人; 硕士; 研究方向为分子生态学; E-mail: gdsxyuedan@126.com

通信作者: 章群, E-mail: tqzhang@jnu.edu.cn

有效措施开发和保护本土野生鱼类资源。

遗传多样性体现了物种对不同环境的适应能力和开发利用的潜力^[15], 是物种保护和开发利用的物质基础。目前对于宽额鳢的报道主要集中在染色体组型分析^[16]、同工酶^[17]以及宽额鳢与同属鱼类的亲缘关系^[18, 19]等方面, 没有中国水系宽额鳢遗传背景的报道。线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 具有结构简单、遵循母系遗传、无基因重组、进化速度比核基因快的特点, 是研究动物群体遗传学和系统发育的理想分子标记^[14, 15]。其中控制区(Control region)遗传变异位点多、进化速率高, 特别适合作为遗传多样性分析, 广泛应用于鱼类种群遗传多样性的研究^[20]。因在广东和广西分布存疑, 本文测定了云南和海南岛 4 个水系 9 个地理群体的宽额鳢控制区序列, 旨在了解遗传背景, 为澜沧江和海南岛种质资源的保护和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2010—2012 年采自云南澜沧江水系的景洪(11 尾)和勐腊(8 尾), 海南岛南渡江水系的白沙(10 尾)、儋州(11 尾), 万泉河水系的石壁(11 尾)、琼中(10 尾)以及昌化江水系的毛阳(5 尾)、乐东(4 尾)和昌江(4

尾)等 9 个地点 74 尾样品经形态鉴定后用 95%乙醇固定保存(图 1)。

1.2 基因组 DNA 的提取

取肌肉组织约 100 mg, 采用标准的酚-氯仿方法提取基因组 DNA, -20°C 保存备用。PCR 扩增引物为本实验室自行设计的: CrRm (5'-CCTGAARTAGG GAACCAAATGCCAG-3'), CrF (5'-TYTCANGGGG NGCGGATACTTGC-3')。PCR 反应体系与反应条件及检测条件参照乐小亮的方法^[21], PCR 产物由华大基因有限公司切胶纯化, 在 ABI3730DNA 自动测序仪上测序。

1.3 数据处理

通过 MEGA6^[22]软件计算碱基组成、转换与颠转比, 群体内与群体间遗传距离, 并以斑鳢(*Channa maculata*)为外类群构建基于 Kimura2-Parameter 模型的单倍型邻接树, 用 1000 次 bootstrap 计算分支支持率。通过 DnaSP5.10^[23]计算单倍型数、核苷酸多样性(π)、单倍型多样性(H_d)、净遗传距离和 Ramos-Onsins & Rozas's R_2 检验^[24]。以 NetWork^[25]软件构建单倍型网络图。根据 Arlequin3.5.1.3^[26]软件计算遗传分化系数(F_{st})和基因流(N_m)值, 进行分子方差分析和核苷酸不配对分析, Tajima's D ^[27]与 Fu's F_s ^[28]中性检验, 获得 SSD 值和 Raggedness 值。

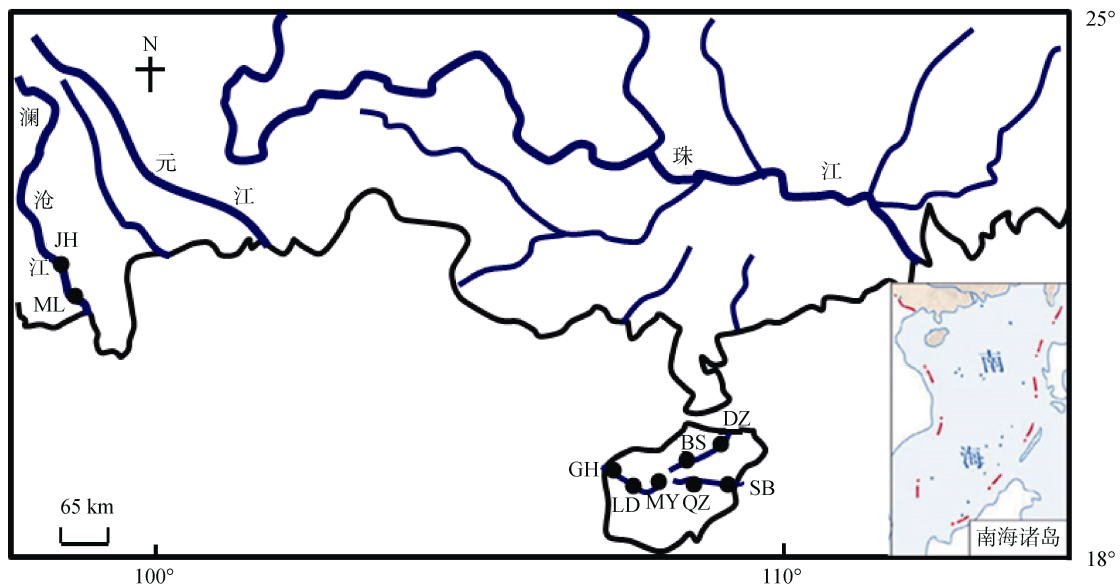


图 1 宽额鳢采样分布图^[30]

Fig. 1 The sampling sites of *Channa gachus*

JH 为景洪, ML 为勐腊, DZ 为儋州, BS 为白沙, SB 为石壁, QZ 为琼中, MY 为毛阳, LD 为乐东, CH 为昌化县
JH. Jinghong, ML. Mengla, BS. Baisha, SB. Shibi, QZ. Qiongzong, MY. Maoyang, LD. Ledong, CH. Changhua

2 结果

2.1 宽额鳢的线粒体 DNA 控制区序列特征和遗传多样性

在 9 个群体 74 尾标本线粒体控制区 5'端 411 bp 序列中, A+T 含量(35.6%+31.6%)高于 G+C 含量(20.1%+12.7%), 其明显的碱基偏歧性与大多数脊椎动物线粒体 DNA 特点一致^[29]。多态位点 52 个, 简约信息位点 46 个, 转换与颠换比为 1.94, 表明该序列没有达到饱和, 适合遗传分析^[22]。在检测到的 20 个单倍型中, 17 个为各群体特有, 3 个为共享单倍型: Hap4 为白沙、儋州和琼中群体共享, Hap5 为白沙和儋州群体共享, Hap6 为乐东、昌江和琼中群体共享。将全部样品作为一个整体分析时, 单倍型多样性(0.903±0.016)高, 而核苷酸多样性(0.036±0.003)低(表 1)。万泉河石壁群体单倍型多样性最高为 0.873, 澜沧江勐腊群体最低为 0.000; 万泉河琼中和石壁群体核苷酸多样性最高, 均为 0.008; 澜沧江勐腊群体最低为 0.000。海南各群体单倍型多样性和核苷酸多样性均不低于云南群体。

2.2 宽额鳢的遗传分化

在邻接树上宽额鳢分为云南(clade 3)、海南毛阳(clade 2)和海南其余群体(clade 1)等 3 个分支(图 2)。单倍型网络图(图 3)呈非典型星状, 云南和海

南单倍型分居网络图两侧。分子方差分析表明, 将 3 个 clade 各为一组时, 谱系间遗传分化极显著(74.35%, $P<0.01$), 谱系内和谱系内群体间遗传分化微弱(20.01%, 5.64%); 将云南群体和海南群体各为一组时, 70.36% ($P<0.01$)的变异来自群组间(表 2), 群组内和群组系内群体间遗传分化微弱(24.48%, 5.17%); 将 clade 1 内群体按水系分为 3 组时, 49.80%的变异来自水系间。参照线粒体控制区 3%—10%/Ma (百万年)^[29], 结合水系间和谱系间的净遗传距离计算出各自的分化时间见表 3。因 clade 2 和 clade 3 包含个体数量较少(31.1%)未作进一步分析。

9 个群体群体内遗传距离为 0.000—0.008 (表 4); 云南 2 个群体间遗传距离为 0.033; 海南 clade 1 中群体间遗传距离为 0.002—0.020; 群体间遗传距离大于群体内遗传距离, 表明群体间有分化。海南 clade 1 与 clade 2 群体间的遗传距离为 0.037—0.046, 海南 clade 2 与云南群体间遗传距离为 0.039—0.063, 海南 clade1 与云南群体间的遗传距离为 0.059—0.091, 表明谱系间均存在遗传分化。 F_{st} 是反映群体间遗传分化的重要指标之一^[31]。谱系间 F_{st} 为 0.786—0.672 (表 3)。海南 clade 1 的南渡江和万泉河水系间的 F_{st} 为 0.615 ($P<0.01$), 基因流 N_m 为

表 1 宽额鳢群体的遗传多样性指数
Tab. 1 The parameters of the genetic diversity in the populations of *C. gachus*

省份 Province	谱系 Pedigree	水系 Drainage	群体 Population	数量 <i>n</i>	单倍型数 <i>N</i>	单倍型多样性 <i>H_d</i>	核苷酸多样性 <i>π</i>	变异位点数 Variable sites	
云南省 YN	Clade 3	澜沧江水系 Lantsang	景洪 JH	11	2	0.182±0.144	0.001±0.001	3	
			勐腊 ML	8	1	0.000±0.000	0.000±0.000	0	
			小计 subtotal	19	3	0.573±0.061	0.017±0.002	3	
		南渡江水系 Nandu River	白沙 BS	10	2	0.467±0.132	0.001±0.000	1	
			儋州 DZ	11	3	0.691±0.086	0.003±0.001	3	
	Clade 1	万泉河水系 Wanquan River	小计 subtotal	21	3	0.600±0.064	0.002±0.000	3	
			琼中 QZ	10	3	0.644±0.101	0.008±0.001	7	
			石壁 SB	11	7	0.873±0.089	0.008±0.002	11	
		昌化江水系 Changhua River	小计 subtotal	21	10	0.890±0.041	0.009±0.002	15	
			乐东 LD	4	2	0.500±0.265	0.002±0.001	2	
海南省 HN	Clade 2	昌化江水系 Changhua River	昌江 CJ	4	3	0.833±0.222	0.006±0.001	4	
			小计 subtotal	8	3	0.464±0.200	0.003±0.001	4	
			毛阳 MY	5	2	0.600±0.175	0.001±0.000	1	
		Clade1&2	昌化江水系 Changhua River	小计 subtotal	13	6	0.821±0.082	0.024±0.003	7
				海南岛 Hainan Island	合计 Total	55	17	0.872±0.028	0.016±0.002
	Clade1&2	海南省和海南省 YN & HN	总计 Total	74	20	0.903±0.016	0.036±0.003	50	

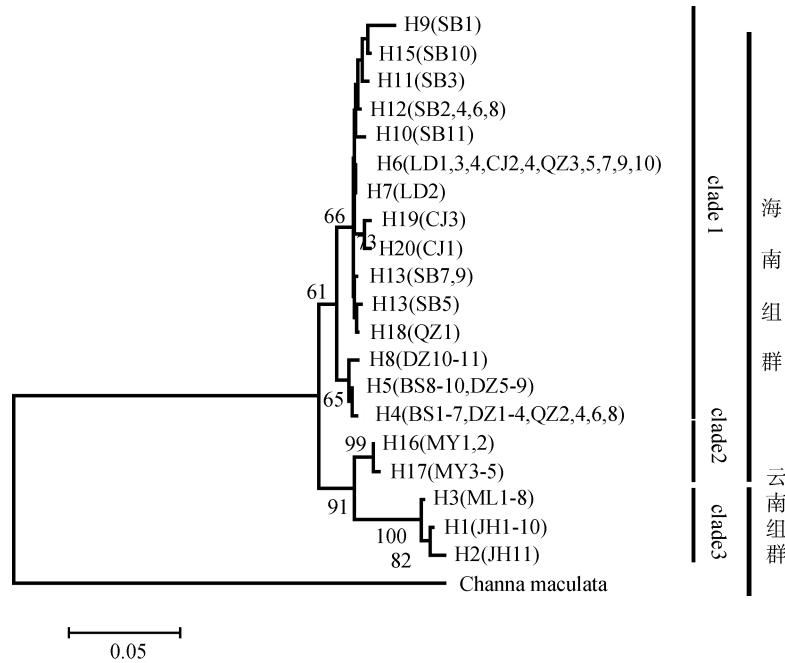


图 2 基于 20 个控制区序列单倍型构建的邻接树

Fig. 2 NJ trees of 20 haplotypes of *C. gachus* based on the sequences of the control region

分支上数字为 1000 次重抽样分析中大于 60% 的支持率。H1-21 表示单倍型 1-21

> 60% bootstrap supports in 1000 replicates were shown on the branches. H1-21 indicates Haplotype 1-21

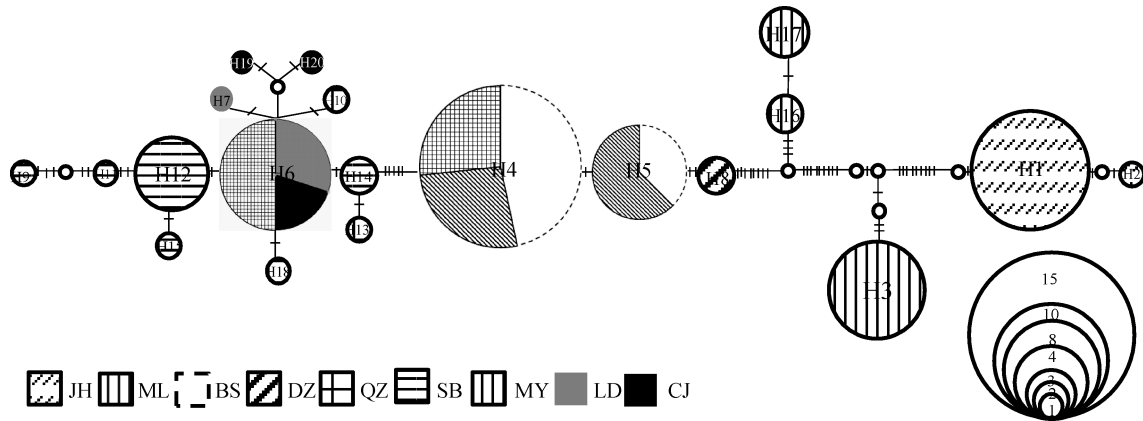


图 3 基于 NetWork 软件构建的宽额鳢单倍型网络图

Fig. 3 The parsimony network of the haplotypes of *C. gachus*

空心圆圈表示可能存在的单倍型, 短线段表示突变步骤

Open circles indicated undetected putative haplotypes, and the short line on the branches represented one mutation step

0.313; 南渡江和昌化江水系间的 F_{st} 为 0.535 ($P < 0.01$), 基因流 N_m 为 0.434; 万泉河和昌化江水系间的 F_{st} 为 0.230 ($P < 0.01$), 基因流 N_m 为 1.674 (表 3)。海南 clade 1 内各水系间的 F_{st} 小于各谱系间。海南 clade 1 中南渡江水系白沙和儋州群体间 F_{st} 为 0.107 ($P > 0.05$), 万泉河水系琼中和石壁群体间 F_{st} 为 0.237 ($P < 0.01$), 昌化江水系乐东和昌江群体间 F_{st} 为 0.167 ($P > 0.05$) (表 4), 表明海南 clade 1 中各水系内 F_{st} 小于水系间。

2.3 宽额鳢的历史动态

整体, clade 1 和 clade 3 核苷酸错配分析均呈现多峰分布 (图 4); Tajima's D 和 Fu's F_s 检验都为非显著负值 ($P > 0.05$), Ramos-Onsins & Rozas's R_2 检验结果 ($R_2 = 0.10 - 0.22$, $P > 0.05$), SSD 和 Raggedness 值较大, 且部分存在显著差异 ($P < 0.05$) (表 5); clade 2 核苷酸错配分析呈现单峰分布, 但中性检验也为非显著负值 ($P > 0.05$); 均表明这些群体没有显著偏离扩张模型, 说明宽额鳢群体在近期历史上没有出现显著的

表 2 宽额鳢云南和海南组群、海南 2 个谱系和 clade 1 内 3 水系的分子方差分析
Tab. 2 The AMOVA analysis of the Yunnan and Hainan populations, two clades of Hainan and 3 river systems in clade 1

序号 Ordinal	分组 Group	项目 Item	组群间 Among groups	组群内 Within groups	组群内群体间 Among populations within groups	总计 Total
I	Group 1(云南群体) Group 2(海南群体)	平方和 Sum of squares	321.632	48.509	200.386	570.527
		变异组成 Variance components	10.164	3.536	0.746	14.446
		变异比例 Percentage of variation	70.360	24.478	5.166	
II	Group 1(clade 1) Group 2(clade 2) Group 3(clade 3)	平方和 Sum of squares	385.651	48.509	136.372	570.532
		变异组成 Variance components	9.840	0.753	2.649	13.242
		变异比例 Percentage of variation	74.352	5.644	20.010	
III	Group 1(clade 1 NDJ) Group 2(clade 1 WQH) Group 3(clade 1 CHJ)	平方和 Sum of squares	58.445	61.809	10.846	131.100
		变异组成 Variance components	1.660	1.405	0.265	3.327
		变异比例 Percentage of variation	49.790	42.217	7.987	

注: I 表示将云南和海南组群各自作为一组进行分析, II 表示将 3 个谱系分别作为一组进行分析, III 表示海南 clade 1 内 3 个水系分别作为一组进行分析

Note: I represented that the Yunnan and Hainan populations were analyzed as independent groups. II represented that the the three clades were analyzed as indepent groups. III represented that three river systems of clade 1 in the Hainan lineage were analyzed as one group

表 3 宽额鳢 2 个地理组群、3 个谱系和从 Clade 1 海南 3 个水系间的遗传分化系数 F_{st} 、遗传距离和分化时间
Tab. 3 The fixation index (F_{st}), genetic distance and differentiation time between 2 regions, 3 clades and 3 river systems of clade 1 from Hainan of *C. gachus*

序号 Ordinal	项目 Item	F_{st}	净遗传距离 D_a	分化时间 Differentiation time (Ma)
I	1 云南组群和海南组群 YN & HN	0.765**	0.057	1.900—0.570
II	1 Clade 1 和 clade 2 Clade 1 & clade 2	0.763**	0.035	1.170—0.350
	2 Clade 1 和 clade 3 Clade 1 & clade 3	0.786**	0.062	2.070—0.620
	3 Clade 2 和 clade 3 Clade 2 & clade 3	0.672	0.044	1.470—0.440
III	1 Clade 1 南渡江和万泉河 NDJ & WQH	0.615**	0.007	0.230—0.070
	2 Clade 1 南渡江和昌化江 NDJ & CHJ	0.535**	0.011	0.370—0.110
	3 Clade 1 万泉河和昌化江 WQH & CHJ	0.230**	0.006	0.200—0.060

注: **表示极显著差异($P<0.01$)

Note: **represented extremely significant difference ($P<0.01$)

表 4 宽额鳢群体内遗传距离(对角线)及两两群体间遗传距离(上对角线)和遗传分化系数(F_{st})(下对角线)
Tab. 4 Pairwise genetic distances within population (diagonal), and the genetic distance (below diagonal), fixation index (F_{st}) (above diagonal) between populations of *C. gachus*

群体 Population	景洪 JH	勐腊 ML	白沙 BS	儋州 DZ	琼中 QZ	石壁 SBZ	毛阳 MYX	乐东 LDX	昌江 CJX
景洪 JH	0.001	0.033	0.082	0.080	0.086	0.088	0.063	0.089	0.091
勐腊 ML	0.979**	0.000	0.060	0.059	0.065	0.067	0.039	0.068	0.071
白沙 BS	0.984**	0.989**	0.002	0.002	0.010	0.019	0.046	0.017	0.019
儋州 DZ	0.973**	0.971**	0.107	0.003	0.011	0.020	0.037	0.018	0.020
琼中 QZ	0.944**	0.928**	0.517**	0.498**	0.008	0.011	0.043	0.007	0.010
石壁 SBZ	0.946**	0.930**	0.751**	0.726**	0.237**	0.008	0.046	0.007	0.009
毛阳 MY	0.978**	0.967**	0.967**	0.932**	0.853**	0.864**	0.001	0.046	0.047
乐东 LD	0.982**	0.989**	0.910**	0.843**	0.178**	0.113	0.957**	0.002	0.005
昌江 CJ	0.973**	0.975*	0.875**	0.819**	0.250*	0.188*	0.927**	0.167	0.006

注: *表示显著差异($P<0.05$), **表示极显著差异($P<0.01$)

Note: * represented significant difference ($P<0.05$), and ** represented extremely significant difference ($P<0.01$)

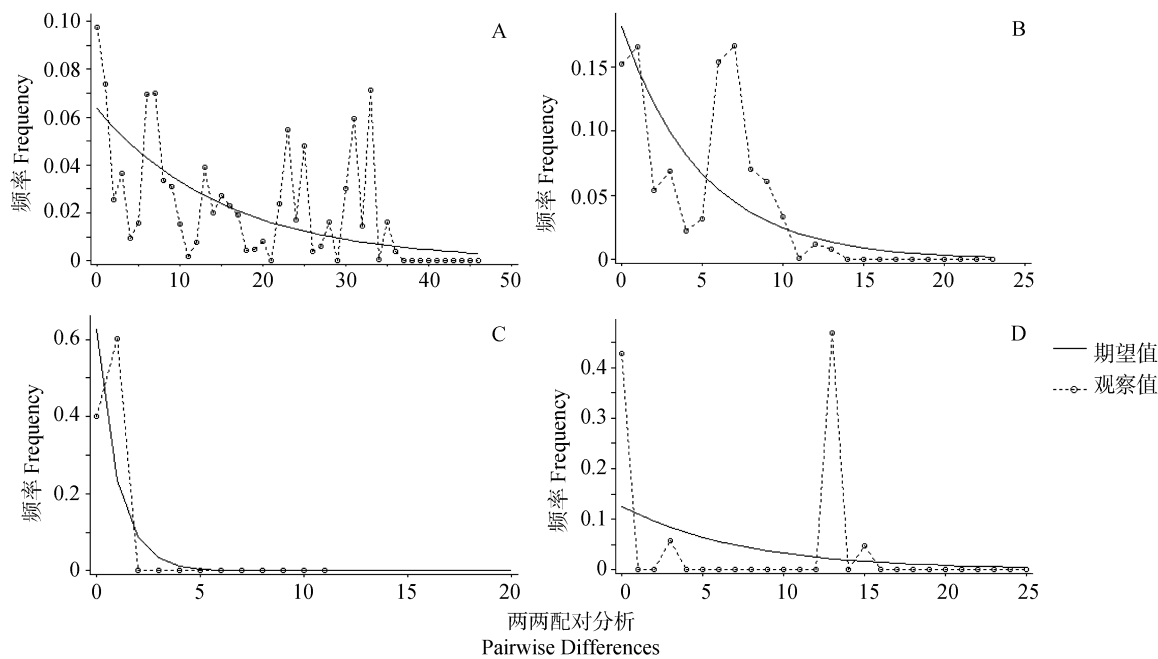


图 4 宽额鳢的核苷酸错配分布图

Fig. 4 The nucleotide mismatch distribution of *C. gachus* (The peak chart were the observed pairwise differences and the solid line represented the expected mismatch distributions)

A 为整体, B 为 clade 1, C 为 clade 2, D 为 clade 3
A. overall, B. clade 1, C. clade 2, and D. clade 3

表 5 宽额鳢的中性检验、不配对分布
Tab. 5 Neutrality tests and mismatch distribution of *C. gachus*

谱系 Pedigree	群体 Population	中性检验 Neutrality tests				R_2	SSD	P	Raggedness	P
		Tajima's D	P	Fu's F_s	P					
Clade 3	景洪 JH	-1.600	0.033	1.136	0.636	—	0.050	0.020	0.742	0.703
	勐腊 ML	0.000	1.000	0.000	—	—	0.000	0.000	0.000	0.000
	云南 YN	2.323	0.990	10.881	0.989	0.141	0.302	0.049	0.632	0.071
Clade 1	白沙 BS	0.820	0.861	0.818	0.524	—	0.009	0.201	0.219	0.379
	儋州 DZ	0.466	0.715	0.895	0.662	—	0.003	0.786	0.060	0.893
	琼中 QZ	1.584	0.961	3.493	0.955	—	0.022	0.273	0.726	0.731
	石壁 SB	-0.553	0.303	-1.432	0.165	—	0.310	0.262	0.114	0.253
	乐东 LD	-0.710	0.252	1.100	0.591	—	0.191	0.258	0.751	0.402
	昌江 CJ	0.650	0.796	0.360	0.467	—	0.231	0.021	0.749	0.159
	海南 HN	-0.110	0.520	-1.740	0.270	0.103	0.034	0.289	0.043	0.341
Clade 2	毛阳 MY	1.225	0.934	0.636	0.503	0.224	0.051	0.569	0.401	0.352
总体 Total		1.481	0.949	4.331	0.894	0.100	0.023	0.566	0.034	0.129

种群扩张^[24—27]。

3 讨论

3.1 宽额鳢的遗传结构

一般认为, 当地理隔离或同一水域中存在不同的栖息环境限制了基因交流, 是鱼类出现种群分化的重要因素^[31]。云南与海南群体间 F_{st} 为 0.765 ($P < 0.01$) 远大于 0.25, 基因流 N_m 为 0.153 远小于 1^[31];

邻接树上云南和海南个体按地理来源聚集形成海南组群和云南组群; 单倍型网络图中海南和云南组群的单倍型间变异步数大于 10; 分子方差分析显示 70.35% 的变异来自云南和海南组群间, 表明云南与海南组群间高度分化, 推测其分化时间为 1.900—0.570 Ma, 即地质时间上属于第四纪。第四纪地质活动前期以喜马拉雅构造期的地质运动为主, 印度陆块和亚欧板块的地壳运动使得云贵高原阶梯式隆起^[32],

从而影响高原鱼类的种群遗传结构,使之不断分化。而第四纪后期(约 78 万年前开始)随着山地的隆起,环太平洋火山活动及地震活动活跃^[33],雷州半岛和海南岛之间发生了断陷,形成琼州海峡,使得海南岛与大陆分开^[34]。宽额鳢因长期的地理隔离和外界环境条件的变化,阻碍了基因交流,进而分化为 2 个云南和海南岛组群,并逐渐演化成现有的分化格局。

值得注意的是,在海南岛昌化江上游的毛阳群体自成一支 clade 2,而包括昌化江中下游在内的海南其余群体单倍型均出现在 clade 1 中,2 个谱系间 F_{st} 为 0.763 ($P < 0.01$) > 0.25 ^[33],推测分化时间为 1.170—0.350 Ma。同一种鱼在一条并不大类型的水系中出现 2 个明显的异域分布谱系,在国内的其他水系并不常见,推测可能是早期海南宽额鳢祖先与云南群体分化后,受五指山脉隆起的地质事件影响,进一步分化为 2 个谱系。毛阳群体位于海拔较高(1000 m 左右)的昌化江上游五指山山区,且五指山隆起的地质时间较早^[35],而其他 6 个群体所处的地势较为平缓,而宽额鳢的活动能力较弱^[1],不同的栖息环境使其产生地理隔离。海南岛 3 个水系的分化时间为 0.370—0.060 Ma (更新世),则可能是更新世冰期气候的变化所致。

另外,澜沧江景洪和勐腊群体间 F_{st} = 0.979 ($P < 0.01$) 远大于 0.25,基因流 N_m 为 0.011 远小于 1,存在高度分化,可能是由于景洪海拔是 560 m 左右,勐腊为 1200 m 左右,2 个群体海拔差距大,温度和气压、气候等因素的差异可能导致生境有所区别^[36],造成基因交流十分困难,进而引起 2 个群体中某些等位基因频率的改变而导致出现遗传分化。

3.2 宽额鳢的遗传多样性

宽额鳢总体单倍型多样性(0.903)高和核苷酸多样性(0.036)低,说明没有足够的时间积累核苷酸多样性^[37];其中万泉河石壁群体单倍型多样性最高为 0.873,琼中和石壁群体核苷酸多样性最高(0.008)。整体的单倍型多样性和核苷酸多样性远高于各个地理群体,可能是谱系分化导致多个谱系叠加所致。海南宽额鳢单倍型多样性(0.872)和核苷酸多样性(0.016)高于海南美丽小条鳅(*Micronoemacheilus pulche*) (H_d = 0.786, π = 0.0101)^[38]、中间黄颡鱼(*Pelteobagrus intermedius*) (H_d = 0.000, π = 0.000)^[39]和唇鲮(*Hemibarbus labeo*) (H_d = 0.889, π = 0.0096)^[40];云南

群体单倍型多样性(0.573)和核苷酸多样性(0.017)高于云南老挝纹胸鲃(*Glyptothorax laosensis*) (H_d = 0.299, π = 0.0003)^[41];原因可能是宽额鳢个体小(体长一般不超过 200 mm),繁殖周期较短(约 2 龄性成熟)^[1],个体数量较多,离水可长时间存活,受恶劣环境的影响相对其他鱼类小。海南各宽额鳢群体的遗传多样性高于云南各群体,则可能是海南和云南栖息地生境的差异,海南岛气候变化相对温和,受冰期影响小,从而维持了较高的遗传多样性^[42]。

3.3 宽额鳢种群历史动态

单倍型网络图(图 3)为非典型星状,整体,2 个谱系(clade 1 和 3)的核苷酸错配分析均呈现多峰分布,整体,3 个谱系以及澜沧江、南渡江、万泉河和昌化江 4 个水系的 Tajima's D 和 Fu's F_s 检验都为非显著负值或正值($P > 0.05$),SSD 和 Raggedness 值较大,且部分存在显著差异($P < 0.05$), R_2 为 0.100—0.224 ($P > 0.05$),说明宽额鳢近期历史上的群体数量较为稳定,未发生过明显的种群扩张^[25—27]。可能是宽额鳢适应力强,离水经久不死,而且主要分布在低纬度热带内陆地区(北纬 19—23°C)。在大多数鱼类出现种群扩张的晚更新世,热带的间冰期年均温比今高 1—2°C 或 2—2.5°C,冰期比现在低 1—2°C 或 1.5—3°C,且冰期河面高度变化较小等因素^[43],使宽额鳢群体没有遭遇严重的“瓶颈效应”,因而较为稳定。

3.4 宽额鳢群体的保护

研究遗传背景不仅可以了解物种的种群遗传结构和种群历史动态,预测物种进化潜能,为制定合理的保护措施提供依据^[44]。宽额鳢遗传多样性总体较为丰富,但各个地理群体相对贫乏。由于人为破坏和自然环境等因素,野生宽额鳢数量不断减少,可能导致遗传多样性的降低,影响物种对复杂环境的适应能力和良种选育,急需采取有效的保护措施保护野生资源。宽额鳢出现 3 个谱系,可以分别作为 3 个管理保护单位。其中澜沧江景洪和万泉河的石壁群体的遗传多样性较高,而毛阳群体独自成支,需优先保护。

参考文献:

- [1] Chu X L, Chen Y R. Yunnan Fishes: The Second [M]. Beijing: Science Press. 1989, 267—268 [褚新洛, 陈银瑞. 云南鱼类志: 下册. 北京: 科学出版社. 1989, 267—268]
- [2] Fisheries Research Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region and Institute of Zoology, Chinese Academy of

- Sciences. Freshwater Fishes of Guangxi Province [M]. Nanning: Guangxi People's Publishing House. 1981, 225—226 [广西壮族自治区水产研究所, 中国科学院动物研究所. 广西淡水鱼类志. 南宁: 广西人民出版社. 1981, 225—226]
- [3] Fisheries Research Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region and Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences. Freshwater Fishes of Guangxi Province (2nd Edition) [M]. Nanning: Guangxi People's Publishing House. 2006, 493—494 [广西壮族自治区水产研究所, 中国科学院动物研究所. 广西淡水鱼类志(第二版). 南宁: 广西人民出版社. 2006, 493—494]
- [4] Pan J H, Liu C H, Zheng W B. Studies on the fish fauna of the Beijiang River, Guangdong Province [J]. *Journal of South China Normal University* (Natural Science), 1984, **1**: 27—40 [潘炯华, 刘成汉, 郑文彪. 广东北江鱼类区系研究. 华南师范大学学报(自然科学版), 1984, **1**: 27—40]
- [5] Pan J H. Fishery Resources of the Beijiang River in the Pearl River Drainage [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press. 1987, 407 [潘炯华. 珠江水系北江渔业资源. 广州: 广东科技出版社. 1987, 407]
- [6] Pan J H, Zhong L, Zheng C Y, *et al.* The Freshwater Fishes of Guangdong Province [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press. 1991, 514—516 [潘炯华, 钟麟, 郑慈英, 等. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社. 1991, 514—516]
- [7] Zheng C Y. The Fishes of the Pearl River [M]. Beijing: Science Press. 1989, 368—369 [郑慈英. 珠江鱼类志. 北京: 科学出版社. 1989, 368—369]
- [8] Li J, Luo J R, Li X H, *et al.* Investigation of fish resources and analysis of resources decline along Lianjiang River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, **37**(3): 49—53 [李捷, 罗建仁, 李新辉, 等. 连江鱼类资源现状调查及资源衰退原因分析. 淡水渔业, 2007, **37**(3): 49—53]
- [9] Li J, Li X H, Tan X C, *et al.* Species diversity of fish community of Provincial Xijiang River rare fishes natural reserve in Zhaoqing City, Guangdong Province [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2009, **21**(4): 556—562 [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. 湖泊科学, 2009, **21**(4): 556—562]
- [10] Li G F. The Investigation and Research of Guangdong Freshwater Fish Resources [M]. Beijing: Science Press. 2013, 345—346 [李桂峰. 广东淡水鱼类资源调查与研究. 北京: 科学出版社. 2013, 345—346]
- [11] Lin X T, Zhang J. Ecology and natural colour images of fish in Dongjiang River [M]. Beijing: China Environmental Science Press. 2013, 135 [林小涛, 张洁. 东江鱼类生态及原色图谱. 北京: 中国环境出版社. 2013, 135]
- [12] Kottelat, M. Fishes of the Nam Theun and Xe Bangfai basins, Laos, with diagnoses of twenty-two new species (*Teleostei: Cyprinidae, Balitoridae, Cobitidae, Coiidae and Odontobutidae*) [J]. *Ichthyologica Exploration Freshwater*, 1998, **9**(1): 1—128
- [13] He D M, Feng Y, Hu J M, *et al.* Southwest China International River Water Resources Utilization and Ecological Protection [M]. Beijing: Science Press. 2007, 180—189 [何大明, 冯彦, 胡金明, 等. 中国西南国际河流水资源利用与生态保护. 北京: 科学出版社. 2007, 180—189]
- [14] Chen B L, Chen X L. Species diversity and distribution of freshwater fishes at Mt. Yinggeling, Hainan Island, China [J]. *Biodiversity Science*, 2008, **16**(1): 44—52 [陈辈乐, 陈湘霖. 海南鹦哥岭地区的鱼类物种多样性与分布特点. 生物多样性, 2008, **16**(1): 44—52]
- [15] Avise J C. Phylogeography: The History and Formation of Species [M]. London Harvard University Press. 2000, 9—32
- [16] Wang J X, Zhou C W. Studies of the Karyotypes of five species of Channid fish in China [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1986, **1**: 47—52 [王金星, 周才武. 我国五种鳢科鱼类的染色体组型研究. 海洋与湖沼, 1986, **1**: 47—52]
- [17] Wang J X, Zhou C W. Comparative studies on the lactate dehydrogenase (LDH) and esterase isozymes in snakehead fishes (*Channidae*) from China [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1987, **18**(1): 64—70 [王金星, 周才武. 中国鳢科鱼类的乳酸脱氢酶和酯酶同工酶的比较研究. 海洋与湖沼, 1987, **18**(1): 64—70]
- [18] Ajaz A B, Haniffa M A, Divya P R, *et al.* Molecular characterization of eight Indian Snakehead species (*Pisces: Perciformes Channidae*) using RAPD markers [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**: 4267—4273
- [19] Lakra W S, Goswami M, Gopalakrishnan A, *et al.* Genetic relatedness among fish species of Genus *Channa* using mitochondrial DNA genes [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, **38**: 1212—1219
- [20] Aquaro C F, Greenberg B D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals [J]. *Genetics*, 1983, **103**: 287—312
- [21] Yue X L, Zhang Q, Zhao S, *et al.* Genetic variation of red seabream (*Pagrus major*) in coastal waters of China inferred from mitochondrial DNA control region sequence analysis [J]. *Guandong Agricultural Sciences*, 2010, **37**(2): 136—139 [乐小亮, 章群, 赵爽, 等. 中国近海真鲷遗传变异的线粒体控制区序列分析. 广东农业科学, 2010, **37**(2): 136—139]
- [22] Koichiro T, Glen S, Daniel P, *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**: 2725—2729
- [23] Librado P, Rozas J. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA Polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, **25**: 1451—1452
- [24] Ramos-Onsins SE, Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, **19**: 2092—2100
- [25] Bandelt H J, Forsrer P R. Median-joining networks for

- inferring intraspecific phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**(1): 37—48
- [26] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **2005**(1): 47—50
- [27] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585—595
- [28] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, **147**(2): 915—925
- [29] Hochachka P W, Mommsen T. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Environmental and Ecological Biochemistry [J]. *Elsevier Science*, 1993, **2**: 1—38
- [30] The map of China's water distribution [M]. Beijing: Sinomap Press. 1990 [中国地图出版社. 中国水系分布图. 北京: 中国地图出版社. 1990]
- [31] Wright S. Evolution and the Genetics of Population: Variability within and among Natural Population [M]. Chicago: University of Chicago Press. 1978, 79—103
- [32] 中国地图出版社. 中国水系挂图[M]. 北京: 中国地图出版社, 2003.
- [33] Wang T F. Tectonic events and stress field in quaternary of China [J]. *Quaternary Research*, 1994, (1): 48—55 [万天丰. 中国第四纪的构造事件与应力场. 第四纪研究, 1994, (1): 48—55]
- [34] Zhang Y M, Xie C F, Fu T A, *et al.* Tectonic Evolution of Hainan Island [J]. *Science Technology and Engineering*, 2005, **20**(5): 1485—1487 [张业明, 谢才富, 付太安, 等. 海南岛地质构造演化刍论. 科学技术与工程, 2005, **20**(5): 1485—1487]
- [35] Hou W. Basic characteristics of crustal evolution in Hainan island, China [J]. *Geotectonica and Metallogenia*, 1992, **16**(2): 131—140 [侯威. 海南岛地壳演化的基本特征. 大地构造与成矿学, 1992, **16**(2): 131—140]
- [36] Zou N, Wang Z X, Lü S Y. The analysis of characteristics of water resources in Lantsang river basin [J]. *Yangtze River*, 2008, **17**: 67—70 [邹宁, 王政祥, 吕孙云. 澜沧江流域水资源量特性分析. 人民长江, 2008, **17**: 67—70]
- [37] Frankham R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife [J]. *Cons Biol*, 1996, **10**(6): 1500—1508
- [38] Qing N, Qiu C F, Liao W Q, *et al.* Population genetic variations and phylogeography of *Micronoemacheilus pulcher* Nichols based on mtDNA control region [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, **30**(1): 0258—0264 [庆宁, 丘城锋, 廖伟群, 等. 华南沿海西部美丽小条鳅基于线粒体控制区的种群遗传变异及亲缘地理格局. 生态学报, 2010, **30**(1): 0258—0264]
- [39] Qing N, LU F Y, Liao W Q, *et al.* Population genetic variations and phylogeography of *Pelteobagrus intermedium* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, **53**(5): 845—852 [庆宁, 吕凤义, 廖伟群, 等. 中间黄颡鱼群体遗传变异与亲缘生物地理. 动物学报, 2007, **53**(5): 845—852]
- [40] Lin C J, Lin H D, Wang J P, *et al.* Phylogeography of *Hemibarbus labeo* (Cyprinidae): secondary contact of ancient lineages of mtDNA [J]. *Zoologica Scripta*, 2010, **39**(1): 23—35
- [41] Jin J. Genetic structural analysis of *Glyptothorax laosensis* in Lancang [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011 [金菊. 澜沧江老挝纹胸鮡遗传结构分析. 武汉: 华中农业大学, 2011]
- [42] Grant W S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *Journal of Heredity*, 1998, **89**(5): 415—426
- [43] Huang Z G, Zhang W Q, Jiang L M. The characteristics of quaternary climate fluctuation in the tropics of China [J]. *Geography and Geo-Information Science*, 2005, **21**(4): 65—70 [黄镇国, 张伟强, 江璐明. 中国热带第四纪气候波动特征. 地理与地理信息科学, 2005, **21**(4): 65—70]
- [44] Loeschke V, Tomiuk J, Jian S K, *et al.* Conservation Genetics [M]. Basel: Birkhauser Verlag. 1994, 37—53

THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION BASED ON MTDNA CONTROL REGION SEQUENCES OF *CHANNA GACHUS* IN THE LANCANG RIVER IN YUNNAN PROVINCE AND THE MAIN RIVERS IN HAINAN PROVINCE OF CHINA

XUE Dan, ZHANG Qun, GAO Xing-Chen, GONG Ya-Yun and CAO Yan

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: *Channa gachus* is a tropical and subtropical species of freshwater carnivorous fish, and they have highly ornamental and economic values in original origins. *C. gachus* usually live in slow-flow rivers, ditches and ponds. As for in China, they mainly inhabit in the Irrawaddy River, the Nujiang River and the Lancang River in Yunnan Province, as well as in some rivers in Hainan Province. Due to the extensive hydraulic construction, river pollution and overfishing, the number of the fish has sharply decreased. To develop effective strategies of protecting its germplasm, it is important to investigate the genetic variance and the structure of the population of this species. Previous studies have focused on the chromosome and the isoenzyme of *C. gachus*, as well as the phylogenetic relationship between *C. gachus* and other species in the same genus. However, the genetic background of this fish remains obscure.

In the present study, we sequenced 411 bp segments of mitochondrial DNA control regions of 74 *C. gachus* individuals collected from 9 populations in the Lancang River in Yunnan Province, and the Nandu River, the Wanquan River and the Changhua River in Hainan Province of China. We observed 52 mutations of nucleotide acids and 20 haplotypes. There were 3 haplotypes shared by 5 populations in Hainan Province, whereas all other haplotypes were unique in each population. We observed 3 distinct lineages in the Kimura2-parameter-based Neighbour-Joining tree. One of them was from Yunnan, and the other 2 were from Hainan—one was the Maoyang population from the Changhua River, another was from the Nandu River and the Wanquan River, and the rest two populations were from the Changhua River. The pairwise fixation index F_{st} was 0.786—0.672, the gene flow was 0.153—0.244, and the inter-clade variation accounted for 74.352% of the total variation. These data indicated a significant genetic differentiation between the 3 clades. The differentiation time of the 3 clades was 2.070—0.350 Ma. The differentiation of the Hainan and Yunnan groups might have been affected by the uplift of Yunnan-Guizhou Plateau and the separation of Hainan Island from Mainland China. Following the isolation from the Maoyang population, the 2 distinct lineages in Hainan Island might be formed under the impact of the uplift of Wuzhi Mountains. Parameters such as the F_{st} (0.765, $P < 0.01$), the gene flow (0.149) and the genetic variation (70.360%) between the Yunnan and Hainan groups indicated a high degree of differentiation. In contrast to the high overall genetic diversity ($H_d = 0.903 \pm 0.016$, $\pi = 0.036 \pm 0.003$), the nucleotide diversity within individual populations was much lower. The nucleotide diversity of the Qiongzong and Shibi populations was the highest (0.008), and the Mengla population had the lowest diversity (0.000). The high overall genetic diversity might result from a mixture of multiple lineages. In the parsimony network of *C. gachus*, the haplotypes from Yunnan Province were on one side, and the haplotypes from the Maoyan population were in the middle, and the remaining from Hainan Island were on the other side. The distribution of the haplotypes showed an atypical star-shape in the parsimony network diagram. The neutrality tests gave a non-significant negative value. Moreover, the mismatch distribution analysis displayed a multimodal distribution. These results suggested that there was no significant expansion in the population in recent history. Because there are 3 lineages of Chinese *C. gachus*, we recommended that they should be treated as 3 separate protected units.

Key words: *Channa gachus*; Lancang River; Hainan Island; mtDNA control region; Genetic variation