

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00009

铜鱼线粒体控制区的序列变异和遗传多样性

袁娟¹ 张其中^{1,2} 李飞^{1,3} 朱成科¹ 罗芬⁴

(1. 西南大学生命科学学院, 水产科学重庆市市级重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632; 3. 第三军医大学中心实验室, 重庆 400038;
4. 宁德高等师范专科学校生物系, 宁德 352100)

摘要: 采用 PCR 和 DNA 测序技术研究长江中上游野生铜鱼的遗传多样性和群体遗传学特征, 从 9 个采样点共获得 100 尾铜鱼, 用于分析的线粒体 DNA 控制区的片段序列为 946 bp。在 100 个序列中, 共检测出变异位点 47 个(其中增添/缺失位点 8 个), 单倍型 41 种。9 个地理群体的平均单倍型多样性(H_d)和平均核苷酸多样性(P_i)分别为 0.9257 ± 0.0162 和 0.004178 ± 0.002337 , 表现出较贫乏的遗传多样性。群体间的分化指数(F_{ST} 值)、平均基因流(N_m)、分子方差分析(AMOVA)和平均 K 2-P 遗传距离均表明 9 个铜鱼地理群体间存在广泛的基因交流, 未明显发生群体遗传分化。另外, 共享单倍型比例较高, 约为 34%(14/41)。单倍型的 UPGMA 分子系统树和简约网络图显示单倍型的聚类与地理分群没有相关性。上述结果表明 9 个铜鱼地理群体属于同一种群。

关键词: 铜鱼; 线粒体控制区; 遗传多样性

中图分类号: Q173 文献标志码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0009-11

线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是细胞质中的双链 DNA 分子, 因具有结构简单、重组率低、进化速度快、不同区域的进化速度存在差异等特征, 已广泛用于分子系统学和分子群体遗传学研究^[1]。鱼类线粒体 DNA 控制区(又称 D-loop 区)是 mtDNA 分子上主要的非编码区, 绝大多数位于 tRNA^{pro} 和 tRNA^{phe} 基因之间, 受选择压力较小, 易积累突变, 如碱基替换和增添/缺失, D-loop 区的进化速率通常是 mtDNA 其他区段的 2.8—5 倍^[2-5]。研究此区段的序列, 能较好地反映种内群体或种间群体的遗传变异情况。目前已有较多利用 D-loop 区进行群体遗传学研究的报道^[6-9]。

铜鱼(*Coreius heterodon* Bleeker)俗称尖头水密子、退鳅、假肥沱等, 隶属于鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鮠亚科(Gobioninae), 铜鱼属(*Coreius*), 广泛分布于长江水系, 特别是长江上游干支流和金沙江下游, 在黄河水系也有分布^[10,11]。铜鱼栖息于

江河流域环境的底层, 其产卵场分布在长江干流的中、上游及主要支流(如汉江、湘江和沅江), 是产漂流性卵的半洄游鱼类^[12]。其肉质鲜美, 是长江中上游的重要经济鱼类^[10]。

然而, 近几十年, 由于环境污染, 以及水利枢纽工程(如葛洲坝、三峡大坝)的修建, 铜鱼的生活环境发生改变。特别是三峡大坝的修建导致三峡水库水流速度显著减缓, 迫使库区内的铜鱼迁移到有明显流水环境的上游及其支流, 监测表明目前长江三峡库区江段的铜鱼资源明显下降^[13]。葛洲坝截流后, 原本未曾发现铜鱼产卵场的长江宜昌下游干流, 在坝下江段形成了新的产卵场^[14]。大坝不仅可能影响铜鱼卵苗的顺水漂流, 也切断了铜鱼繁殖的上溯洄游路线, 使铜鱼的生活和繁殖区域明显分为坝上和坝下两个江段。而且, 三峡水库全面蓄水的迴水区将至重庆, 水文条件发生重大改变, 宜昌至重庆江段的铜鱼产卵场将受严重影响^[12]。因此, 铜鱼资源

收稿日期: 2008-07-18, 修订日期: 2009-03-12

基金项目: 重庆市重大科技攻关项目(CSTC, 2005AB1009); 三峡库区生态环境教育部重点实验室基金资助

作者简介: 袁娟(1982—), 女, 江西临川人; 硕士研究生; 主要从事鱼类分子遗传研究。E-mail: jxsdyjmm@163.com

通讯作者: 张其中, 男, 教授; E-mail: zqz666@sina.com

将会显著下降。为了保护和可持续利用铜鱼资源，急需阐明该鱼的遗传资源现状。目前，已有铜鱼微卫星标记的报道^[15]，但对铜鱼遗传多样性的研究却得出相反的结论，即分别认为铜鱼的遗传多样性较低^[16]和较丰富^[17]，这一矛盾需要进一步研究解决。同时，在三峡水库形成之初，研究该水库及其邻近的上下游和支流江段铜鱼的群体遗传特点和遗传多样性，为长期追踪研究该鱼种群遗传结构变化的过程，揭示鱼类适应环境的遗传机制，提供可比较的本底资料，也可为将来铜鱼的人工育种提供理论

指导。

1 材料与方法

1.1 样本采集

自 2005 年 3 月至 2006 年 11 月在长江中上游干支流 9 个采样点(合川、木洞、涪陵、万州、巫山、三斗坪、宜昌、岳阳、金口)采集野生铜鱼标本 100 尾(图 1 和表 1)，用 100%乙醇固定，保存于西南大学生命科学学院水生动物研究室。标本鉴定参照陈宜瑜等^[11]的检索系统完成。

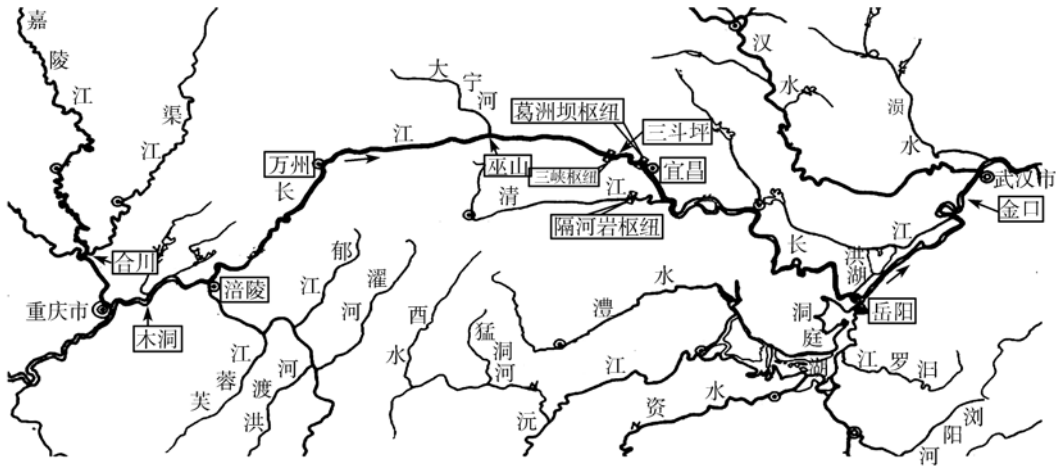


图 1 九个采样点在长江的位置分布
Fig. 1 Location of 9 sampling sites in the Yangtze River

表 1 标本数和采集地
Tab. 1 Specimen number of 9 sampling sites in the Yangtze River

群体名 Group name	取样点 Sampling site	相对位置 Location of sampling site	标本数量(尾) Number of specimen
HC	合川 Hechuan	嘉陵江(长江支流) ^a	7
MD	木洞 Mudong	长江葛洲坝上游 ^b	11
FL	涪陵 Fuling	长江葛洲坝上游 ^b	11
WZ	万州 Wanzhou	长江葛洲坝上游 ^b	11
WS	巫山 Wushan	长江葛洲坝上游 ^b	12
SDP	三斗坪 Sandouping	长江葛洲坝上游 ^b	14
YC	宜昌 Yichang	长江葛洲坝下游 ^c	11
YY	岳阳 Yueyang	长江葛洲坝下游 ^c	11
JK	金口 Jinkou	长江葛洲坝下游 ^c	12
合计 Total			100

注: “a” 代表嘉陵江(长江支流), “b”代表长江葛洲坝上游, “c” 代表长江葛洲坝下游
Note: “a” is Jialing River (a tributary river of Yangtze River). “b” is an upper section of the Yangtze River located above Gezhouba Dam. “c” is lower section of the Yangtze River located below Gezhouba Dam

1.2 总 DNA 提取

用酚-氯仿法^[18]，从鳍条中提取总 DNA。用琼脂

糖凝胶电泳检测总 DNA 的提取结果，并用核酸蛋白定量仪(Bio-Rad Smartspic plus)检测纯度和测定浓度。

1.3 PCR 扩增及序列测定

50 μL 的 PCR 反应体系包括 100 ng 模板, 10 $\times$ PCR Buffer 5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 4 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.4 μL 。扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min, 然后进行 36 个循环, 包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s、57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 直接送上海英骏生物技术有限公司测序。扩增和测序所用的引物相同, 正向引物 DL1(5'-ACCCC-TGGCTCCCAAAGC-3')和反向引物 DH2(5'-ATCT-TAGCATCTTCAGTG-3')分别位于 tRNA^{pro} 和 tRNA^{phe} 上^[5]。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 数据分析

用 Clustal X 1.83 软件^[19]进行多重序列比对, 并在 SEAVIEW 程序^[20]中辅以手工校正。然后, 应用 DnaSP 4.50.3 软件^[21]分析单倍型并输出变异位点, 计算平均基因流(N_m), 进行序列的中性检测(Tajima 检验和 Fu & Li 检验)和 Mismatch 分析。应用 Arlequin v3.01 软件^[22], 根据 pairwise difference 模型, 统计单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(P_i)及其标准差(SD), 并计算群体间的分化指数(F_{ST} 值)和进行分子方差分析(AMOVA)。MEGA 3.1 软件^[23]用于统计序列的碱基含量, 根据 Kimura 2-parameter 模型, 计算群体内和群体间的平均遗传距离, 并以圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*) (GenBank 序列号为 EU871762) 为外类群, 构建单倍型的 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic averages)分子系统树。用 TCS 1.21 软件构建单倍型间的简约网络图, 置信度大于 95%, 且考虑缺失位点。

2 结 果

2.1 序列变异分析

分析野生铜鱼 mtDNA D-loop 区的 946 bp 序列发现, 100 个序列共有 41 种单倍型(GenBank 序列号为 EU871727-EU871761 和 FJ376077-FJ376082)。该 DNA 片段中 T、C、A、G 的平均含量分别为 31.5%、20.5%、34.4%和 13.6%, A+T 的含量明显高于 G+C 的含量。同时, 所分析的序列表现出明显的反 G 偏向。946 个位点中, 保守位点 899 个, 变异位点 47 个(包括 8 个增添/缺失位点和 39 个多态性位点)。由

于增添/缺失位点的存在, 各单倍型的总碱基数量存在一定差异, 出现了 D-loop 序列的长度多态性。位点 nt672—nt675 的碱基增添/缺失正好就是此长度多态性出现的主要原因, 这 4 个位点的变异实质是 nt664—nt675 出现长度不一的 AT 重复片段, 重复次数为 4—6 次不等。由分布情况(图 2)可知, 多态性位点主要位于该片段的 tRNA^{pro} 端和中间部位, 靠近 tRNA^{phe} 端的序列较为保守。39 个多态性位点的转换明显多于颠换, 其中 34 个位点只表现转换(13 个 A/G 转换, 21 个 C/T 转换), 4 个位点只表现颠换, 另有 1 个位点(nt198, 即第 198 号核苷酸位点)既出现转换(C/T)又出现颠换(C/G)。所分析的多态性位点包含 20 个简约信息位点和 19 个单碱基突变位点。

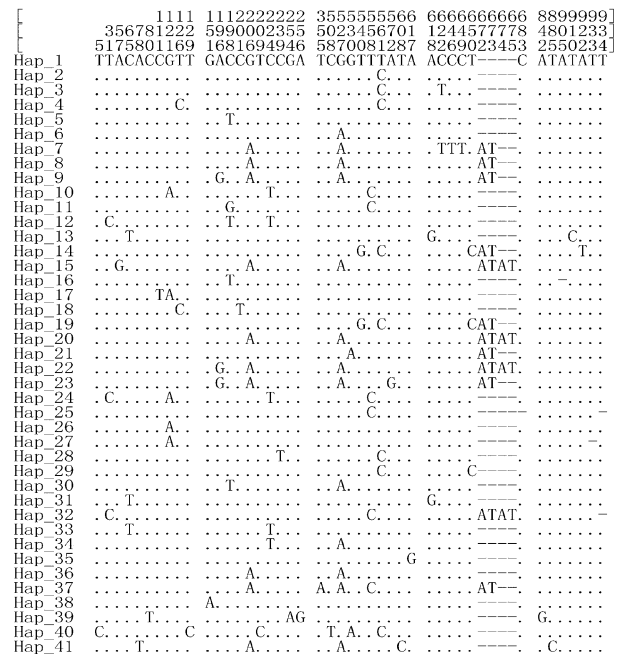


图 2 41 种单倍型的变异位点分布

Fig. 2 Location of mutative nucleotide acids in 41 haplotypes of *Coreius heterodon*

图左边 Hap1-41 表示单倍型名称; 上方数字表示变异位点在单倍型中的相应碱基位置, 例如, 前 3 个变异位点对应的碱基位置分别是 nt5、nt31 和 nt57; 圆点(.)表示与第一种单倍型 Hap1 有相同的碱基组成, 横线(-)表示碱基缺失

Hap1-41 on left are the names of 41 haplotypes, respectively. Numbers at top represent the locations of mutative nucleotide acids in the 41 haplotypes of *C. heterodon*. For example, the first three mutative nucleotide acids are located in nt5, nt31 and nt57, respectively. Dots indicate the bases are the same as haplotype 1 (Hap1). Transverse lines denote the base deletion

分析 41 种单倍型在 9 个群体中的分布, 结果显示, 共享单倍型比例较高, 约为 34%(14/41), 其中

Hap1 和 Hap2 分布广泛, 可能是原始的单倍型。 Hap2 分布于 9 个群体中, 共 18 个个体表现为 Hap2。
Hap1 分布于 8 个群体中, 共 19 个个体表现为 Hap1; 27 种单倍型存在于单个群体中(表 2)。

表 2 41 种单倍型在 9 个群体中的分布
Tab. 2 Distribution of 41 haplotypes in 9 geographic populations of *C. heterodon* from the upper and middle sections of the Yangtze River

	HC	MD	FL	WZ	WS	SDP	YC	YY	JK	合计 Total
Hap1	1	3	3	3	3	2	2		2	19
Hap2	1	2	4	2	3	1	1	2	2	18
Hap3	1									1
Hap4	1									1
Hap5	1		1				1			3
Hap6	1	1			3					5
Hap7	1									1
Hap8		1			1			1	1	4
Hap9		1		1					1	3
Hap10		1								1
Hap11		1								1
Hap12			1							1
Hap13			1							1
Hap14			1							1
Hap15				1				1		2
Hap16				1						1
Hap17				1		1				2
Hap18				1		1				2
Hap19				1						1
Hap20					1	1	1		1	4
Hap21					1					1
Hap22						1		1		2
Hap23						1		1		2
Hap24						1				1
Hap25						1				1
Hap26						1	1			2
Hap27						1				1
Hap28						1				1
Hap29						1				1
Hap30							1			1
Hap31							3	1	1	5
Hap32								1		1
Hap33								1		1
Hap34								1		1
Hap35									1	1
Hap36		1								1
Hap37							1			1
Hap38								1		1
Hap39									1	1
Hap40									1	1
Hap41									1	1
合计 Total	7	11	11	11	12	14	11	11	12	100

2.2 群体遗传多样性和群体间的遗传分化

分析表明, 各群体的遗传多样性差异不明显, 100 个序列的平均单倍型多样性(Hd)和平均核苷酸多样性(Pi)分别为 0.9257 ± 0.0162 和 0.004178 ± 0.002337 (表 3)。从核苷酸多样性(Pi)看, 岳阳群体(YY)最高(0.005920 ± 0.003473), 巫山群体(WS)最低(0.002707 ± 0.001757), 说明在 9 个铜鱼群体中, 岳阳群体的遗传多样性相对最丰富, 而巫山群体的遗传多样性相对最低。

用 Arlequin v3.01 软件分析 F_{ST} 值, 结果显示, 9

个铜鱼群体间的 F_{ST} 值均较低, 还有许多是负值, 说明群体间存在较大的基因流, 遗传分化不明显(表 4)。而且, 仅涪陵群体(FL)与岳阳群体(YY)间的 F_{ST} 值的差异显著性检验值 $0.01<P<0.05$, 表明这两个群体间存在显著分化; 其他所有两两群体间的 F_{ST} 值的差异显著性检验值 $P>0.05$, 表明绝大多数群体间的遗传分化不明显。另外, 用 DnaSP 4.50.3 软件, 根据 F_{ST} 值计算出 9 个群体的平均 Nm 为 20.84, 表明群体间的基因交流很频繁。

表 3 群体内遗传多样性参数
Tab. 3 Genetic diversity parameters within every geographic population of *C. heterodon* from the upper and middle sections of the Yangtze River

群体 Group name	样本数 No. of samples	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity ($Hd\pm SD$)	平均核苷酸差异数 Average number of pairwise differences ($K\pm SD$)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity ($Pi\pm SD$)
HC	7	7	1.0000 ± 0.0764	3.523810 ± 2.036578	0.003733 ± 0.002471
MD	11	8	0.9273 ± 0.0665	2.981818 ± 1.685944	0.003159 ± 0.002015
FL	11	6	0.8364 ± 0.0887	2.690909 ± 1.548340	0.002851 ± 0.001850
WZ	11	8	0.9273 ± 0.0665	4.145455 ± 2.232781	0.004382 ± 0.002663
WS	12	6	0.8636 ± 0.0639	2.560606 ± 1.476553	0.002707 ± 0.001757
SDP	14	13	0.9890 ± 0.0314	4.879121 ± 2.530351	0.005158 ± 0.003003
YC	11	8	0.9273 ± 0.0665	3.709091 ± 2.028231	0.003921 ± 0.002419
YY	11	10	0.9818 ± 0.0463	5.600000 ± 2.912044	0.005920 ± 0.003473
JK	12	10	0.9697 ± 0.0443	5.196970 ± 2.705177	0.005494 ± 0.003220
合计 Total	100	41	0.9257 ± 0.0162	3.951919 ± 1.995626	0.004178 ± 0.002337

表 4 长江中上游 9 个铜鱼群体之间的 F_{ST} 值
Tab. 4 F_{ST} value between 9 geographic populations of *C. heterodon* from the upper and middle sections of the Yangtze River

	HC	MD	FL	WZ	WS	SDP	YC	YY
HC								
MD	-0.02215							
FL	-0.01091	0.05714						
WZ	-0.04723	-0.03904	-0.00388					
WS	-0.02523	-0.04766	0.06601	-0.04481				
SDP	-0.01098	-0.04043	0.03461	-0.05094	-0.01480			
YC	0.00758	-0.01709	0.03682	-0.01538	-0.00048	-0.00466		
YY	0.04703	0.01105	0.12765**	-0.00102	0.00375	0.00030	0.01366	
JK	-0.03118	-0.04184	0.03837	-0.04054	-0.04990	-0.01694	-0.02346	-0.01918

注: **表示 $0.01<P<0.05$ Note: ** stands for $0.01<P<0.05$

AMOVA 分析表明, 群体内个体间的变异是总变异的主要来源(99.66%), 只有 0.34%的变异发生在群体间($F_{ST}=0.00341$, $P>0.1$) (表 5)。这一结果也说明 9 个群体间的差异不显著, 遗传分化不明显, 群体间存在广泛的基因交流。另外, 根据 Kimura

2-parameter 模型计算出, 9 个群体内的平均遗传距离为 0.00151—0.00434, 群体间的为 0.00192—0.00389(表 6)。此结果表明, 9 个群体间的平均遗传距离与群体内的处于同一水平, 没有体现群体的遗传分化。

表 5 对 9 个群体的 AMOVA 分析
Tab. 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) among and within geographic populations

变异来源 Source of variation	自由度 d. f.	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异百分比 Percentage of variation	F_{ST}	P
群体间 Among populations	8	11.691	0.00481	0.34	0.00341	>0.1
群体内个体间 Within populations	91	128.139	1.40813	99.66		
总计 Total	99	139.831	1.41294			

表 6 九个体群内和群体间的平均 K 2-P 遗传距离
Tab. 6 Average genetic distance within and between 9 geographic populations of *C. heterodon* based on Kimura 2-parameter model

	HC	MD	FL	WZ	WS	SDP	YC	YY	JK
HC	0.00316*								
MD	0.00281	0.00249*							
FL	0.00282	0.00271	0.00249*						
WZ	0.00292	0.00262	0.00268	0.00292*					
WS	0.00228	0.00192	0.00220	0.00216	0.00151*				
SDP	0.00333	0.00284	0.00312	0.00304	0.00251	0.00342*			
YC	0.00313	0.00269	0.00285	0.00293	0.00228	0.00323	0.00288*		
YY	0.00352	0.00295	0.00342	0.00332	0.00258	0.00355	0.00327	0.00370*	
JK	0.00371	0.00330	0.00360	0.00355	0.00283	0.00388	0.00360	0.00389	0.00434*

注: *表示群体内的平均遗传距离(对角线), 对角线下方的数据表示群体间的平均遗传距离

Note: * Indicates the average K 2-P distance within a geographic population. The numbers below diagonal stand for the average K 2-P distance between 9 geographic populations

2.3 单倍型间的聚类关系

用 MEGA 3.1 软件, 根据 Kimura 2-parameter 进化参数模型, 构建单倍型的 UPGMA 分子系统树(图 3)。用 TCS 1.21 构建单倍型的简约网络图(图 4)。结果显示, 图 3 的 A 支与图 4 的 类、 类和 类基本对应, B 支与图 4 的 类基本对应。但也存在少数的不一致情况, 例如单倍型 Hap21、Hap32、Hap36 和 Hap41 在图 3 中的聚类(用方框标出)与图 4 中的(用 * 标出)不相同。Hap21 和 Hap32 在图 3 中聚类于 A 支, 在图 4 中却聚类于 类; Hap36 和 Hap41 在图 3 中聚类于 B 支, 在图 4 中却聚类于 类。尽管两种方法所得的 41 种单倍型的聚类结果不尽一致, 但这两个聚类图的结果均显示单倍型的聚类与地理分群没有相关性。此外, 单倍型的简约网络图显示, 41 种单倍型基本聚类成 4 大支, 4 个类群所占比例相差不大, 没有出现明显的优势类群; 单倍型 Hap1 和 Hap2 为较多个体共享, 其中, Hap1 位于网络图的扩展中心, 可能是最原始的单倍型。

2.4 序列中性检测和 Mismatch 分析

9 个野生铜鱼群体 D-loop 序列的核苷酸不配对分布曲线呈单峰形(图 5)。另外, 对 100 个序列进行

中性检测(Tajima 检测和 Fu & Li 检测), Tajima's D 为 -1.98989 ($P<0.05$), Fu's F_s 为 -30.848 ($P=0.00$)。

3 讨论

3.1 铜鱼的遗传多样性分析

遗传多样性是生物多样性的基础, 是物种长期生存和进化的前提, 也是物种进化潜能的保证。研究 100 尾野生铜鱼 D-loop 区的 946 bp 序列, 共检测出变异位点数 47 个, 单倍型 41 种, 计算出单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(P_i)分别为 0.9257 ± 0.0162 和 0.004178 ± 0.002337 。与圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)^[17]、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[24]、暗鳊(*Siniperca obscura*)^[25]和刀鲚(*Coilia nasus*)^[26]相比, 铜鱼的遗传多样性更低; 相比已被列为国家二级保护动物的中国胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)^[27]、已被列为三级急切保护鱼类的岩原鲤(*Procypris rabaudi*)^[28]和野生濒危物种鳊白鱼(*Anabarilius grahami*)^[29], 铜鱼的遗传多样性稍显丰富。由此可见, 目前长江中上游的野生铜鱼遗传多样性总体上相对较为贫乏。这与严莉^[16]应用 D-loop 区序列研究长江的万州、沙市、湖口和

常熟四个采样点的铜鱼遗传多样性所得结论一致。但是, 廖小林^[17]用克隆技术获得长江铜鱼的 D-loop 全序列, 用该序列和微卫星标记分析铜鱼的遗传多样性, 认为长江铜鱼的遗传多样性较为丰富。其 D-loop 序列的分析结果显示 7 个群体的 H_d 为 0.8444—0.9778, P_i 为 0.0028—0.0047, 这两个衡量群体遗传多样性的重要参数(H_d 和 P_i), 与本研究的结果($H_d=0.8364-1.0000$, $P_i=0.002707-0.005920$)(表 3)其实很接近, 但我们通过上述与其他鱼类的比较认为长江中上游的野生铜鱼遗传多样性总体上相对较为贫乏, 与廖小林的结论相反。廖小林所统计的 D-loop 序列的变异位点数与本研究的相差较大,

991 bp 序列含变异位点 78 个, 其中单碱基突变位点为 55 个, 其原因可能正如其所分析的, 约有 1/6 的点突变来自于 PCR 扩增和大肠杆菌的复制过程^[17]。

87 个 D-loop 序列的核苷酸不配对分布曲线呈单峰形, 而且中性检测的 Tajima's $D(-1.98989$, $P<0.05$)和 Fu's $F_s(-30.848$, $P=0.00)$ 均为负值。此结果说明长江中上游的野生铜鱼可能曾经历过近期群体扩张或“遗传瓶颈”, 由一个较小的有效种群适应长江的生态环境逐渐发展形成现在的种群, 这可能就是目前长江中上游的野生铜鱼遗传多样性总体较为贫乏的原因之一。

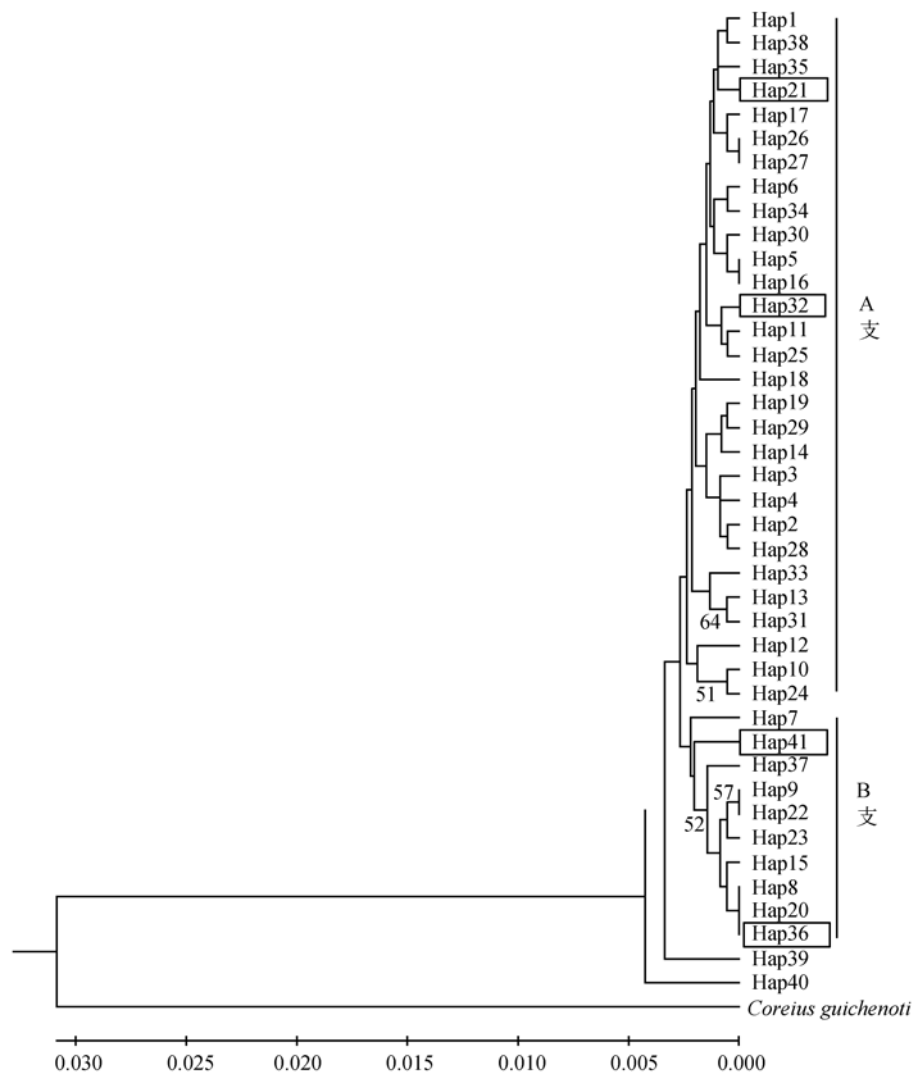


图 3 用 D-loop 序列构建的铜鱼单倍型分子系统树(UPGMA 树)

Fig. 3 Rooted molecular phylogenetic tree (UPGMA tree) of haplotypes based on the D-loop region sequence of *C. heterodon*. *Coreius guichenoti* is an outgroup, system tree branch numbers represent greater than 50% bootstrap support rate, rectangle represents haplotypes located in different cluster of both molecular phylogenetic tree and parsimony network (Fig. 4)

Coreius guichenoti is used as an outgroup. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (greater than 50%) with 1000 replicates. The haplotypes in rectangle represent those located in different cluster of both molecular phylogenetic tree and parsimony network (Fig. 4)

但是, 遗传结构的变化是一个逐渐积累的过程, 而大坝截流至今的时间较短, 因此, 葛洲坝和三峡大坝等水利枢纽工程对长江铜鱼遗传多样性和遗传结构的影响与否, 还有待继续跟踪研究。本研究所用材料都采集于三峡工程全线截流(2002 年 11 月)的初期, 所得线粒体 D-loop 区序列和遗传多样性参数为以后长期监测三峡水利工程对铜鱼遗传多样性和遗传结构的影响提供了可对比的本底资料, 也为铜鱼渔业资源的保护和合理利用提供了理论依据。

另外, 分析长江干流铜鱼群体之间, 以及它们与支流铜鱼群体(合川群体)之间的 F_{ST} 值, 结果显示皆处于同一水平, 未表现干流与支流群体的分化。遗传距离分析结果亦如此。由此表明, 长江铜鱼的干流和支流群体之间存在频繁的基因交流, 未表现遗传分化。这可能是由于所研究的铜鱼处于一个连续的水系中, 且铜鱼具有产漂流性卵和半洄游的生活习性。

3.3 长江铜鱼的资源保护

群体的遗传多样性是评价生物资源状况的重要依据。遗传多样性的降低或丧失, 对于生活在多变环境中的野生群体是极大威胁^[26]。研究结果显示, 长江中上游的野生铜鱼群体遗传多样性较为贫乏。而且大坝的兴建致使铜鱼原有的生活环境、产卵场、繁殖条件等都发生巨大改变, 可导致长江铜鱼资源下降。此外, 铜鱼是长江的重要经济鱼类, 过度捕捞严重, 陈大庆等^[30]认为目前长江中上游的铜鱼属于重度超额开发。李修峰等^[31]研究汉江(长江最大支流)中游的鱼类资源发现, 由于过度捕捞和水利枢纽工程(如丹江口大坝)的修建, 20 世纪 70 年代渔获量占第二位的铜鱼, 目前已基本消失。嘉陵江下游的铜鱼资源也已失去渔业价值, 20 世纪 70 年代其渔获量比重为 25.27%(居第二位), 现已降至 0.35%^[32]。三峡水库蓄水后, 长江中游的铜鱼产卵量也大幅度下降, 2006 年的铜鱼鱼苗资源量仅为 2003 年的 10.8%^[33]。因此, 对长江铜鱼资源的保护迫在眉睫。为了保护 and 可持续利用铜鱼资源, 建议采取如下措施:

加强铜鱼人工养殖的研究 人工养殖一方面可减轻人类对铜鱼自然资源的捕捞压力, 另一方面可通过放流在恢复天然铜鱼资源中发挥作用。研究长江中上游铜鱼的遗传多样性, 可为铜鱼的人工育种提供理论指导。根据铜鱼遗传多样性和遗传结构,

尽可能地选择亲缘关系较远的亲鱼进行人工繁殖, 避免近交产生的遗传性状衰退, 保证长江铜鱼的种质资源。

加强自然保护区建设 三峡水库蓄水后, 宜昌至重庆江段的大量铜鱼产卵场被淹没, 而且水库水流速度显著减缓, 迫使库区内的铜鱼迁移到库区上游及其支流。对于向上迁移的铜鱼群体, 合江-雷波江段的“长江上游珍稀鱼类自然保护区”无疑是一个宝贵的“避风港”。但是, 随着金沙江梯级水电工程和长江流域其他水利工程的开发, 该保护区及其对鱼类资源的保护效果势必会受到一定程度的影响。为了更有效地保护铜鱼等长江鱼类资源, 有必要加大自然保护区建设和投入的力度, 有专家建议在赤水河等支流再建设一些自然保护区。

延长禁渔期, 加强渔业管理 在鱼类的繁殖季节, 实施休渔、禁渔制度, 有利于保护繁殖的亲鱼群体和孵化的幼鱼。国家规定的长江流域禁渔期: 葛洲坝以下江段为每年 4 月 1 日至 6 月 30 日(2002 年起), 葛洲坝以上江段为每年 2 月 1 日至 4 月 30 日(2003 年起)。中下游江段的铜鱼产卵期基本处于禁渔期中, 但是上游江段的铜鱼的产卵期为 4 月上旬至 5 月下旬(其中 4 月中旬至 5 月上旬为产卵盛期), 且支流铜鱼的产卵时间迟于干流^[12]。因此, 建议将长江流域的禁渔期延长, 特别是上游江段的禁渔期; 或者仅延长产卵场江段的禁渔期, 加强区域性禁渔; 对于拥有铜鱼产卵场的支流, 也应根据产卵期调整相应的禁渔期。同时, 对于铜鱼过度捕捞和严重低龄化的现状, 应加强渔业资源的管理。严厉打击炸鱼、毒鱼和电鱼等严重损害鱼类资源的捕捞方式, 取缔小网目的定置刺网等有害网具。

调整水库调度方式 三峡大坝蓄水后, 由于水库的调蓄作用, 坝下江段的洪峰被削平, 涨幅减弱。坝下铜鱼的产卵量也因此大幅下降^[34]。建议三峡大坝在 4—6 月(坝下铜鱼产卵期)调度时, 可以根据铜鱼繁殖生物学特征, 通过水库调度技术制造人造洪峰, 促使坝下铜鱼繁殖产卵。

致谢:

中国科学院水生生物研究所的何舜平研究员和彭作刚博士, 中国科学院成都生物所的郭宪光博士, 西南大学生命科学学院王德寿教授及其课题组成员, 在试验数据分析、论文写作和修改过程中提供了大量帮助, 在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 384—391 [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384—391]
- [2] Brown W. The mitochondrial genome of animals [A]. In: Macintyre R (Eds.), *Molecular Evolutionary Genetics* [C]. New York: Plenum. 1985, 95—130
- [3] Hillis D M, Moritz C, Mable B K. *Molecular Systematics* [M]. 2nd ed. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates. 1996
- [4] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [A]. In: Hochachka P W, Mommsen T P (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes (Vol.2)* [C]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1993, 1—38
- [5] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, 80(3): 569—581
- [6] Bremer J R A, Mejuto J, Baker A J. Mitochondrial DNA control region sequences indicate extensive mixing of swordfish (*Xiphias gladius*) populations in the Atlantic Ocean [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1995, 52: 1720—1732
- [7] Ostellari L, Bargelloni L, Penzo E, et al. Optimization of single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of the mitochondrial control region in *Pagellus bogaraveo* (Sparidae, Teleostei): rationalized tools in fish population biology [J]. *Animal Genetics*, 1996, 27(6): 423—427
- [8] McMillan W O, Palumbi S R. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae) [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1997, 45(5): 473—484
- [9] Donaldson K A, Wilson R R. Amphipanamic Geminates of shoo (Percoidei: Centropomidae) provide calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1999, 13: 208—213
- [10] Ding R H. The fishes of Sichuan [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science and Technology. 1994, 273—276 [丁瑞华. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社. 1994, 273—276]
- [11] Chen Y Y. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes II [M]. Beijing: Science Press. 1998, 325—327 [陈宜瑜等编. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(中卷). 北京: 科学出版社. 1998, 325—327]
- [12] Xu Y G, Deng Z L, Yu Z T, et al. The biological aspects of *Coreius heterodon* (Bleeker) and the effects of proposed Sanxia hydroelectric project on its resource [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1981, 7(3): 271—294 [许蕴珩, 邓中彝, 余志堂, 等. 长江的铜鱼生物学及三峡水利枢纽对铜鱼资源的影响. 水生生物学集刊, 1981, 7(3): 271—294]
- [13] Duan X B, Chen D Q, Liu S P, et al. Studies on status of fishery resources in Three Gorges Reservoir reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(6): 605—611 [段辛斌, 陈大庆, 刘绍平, 等. 长江三峡库区鱼类资源现状的研究. 水生生物学报, 2002, 26(6): 605—611]
- [14] Liu L H, Wu G X, Wang Z L. Reproduction ecology of *Coreius heterodon* (Bleeker) and *Coreius guichenoti* (Savage et Dabry) in the mainstream of the Changjiang River after the construction of Gezhouba Dam [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, 14(3): 205—215 [刘乐和, 吴国犀, 王志玲. 葛洲坝水利枢纽建成后长江干流铜鱼和圆口铜鱼的繁殖生态. 水生生物学报, 1990, 14(3): 205—215]
- [15] Liao X, Zhu B, Yu X, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, grass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 393—395
- [16] Yan L. Studies on biology of stocks and genetic diversity of *Coreius heterodon* (Bleeker) [D]. Thesis for Master of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 2006, 40—41 [严莉. 长江铜鱼种群生物学及遗传多样性分析. 硕士学位论文, 华中农业大学, 武汉. 2006, 40—41]
- [17] Liao X L. Development of molecular markers and population genetic analyses in several important fishes distributed in the Yangtze River system [D]. Thesis for Doctor of Science. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2006 [廖小林. 长江流域几种重要鱼类的分子标记筛选开发及群体遗传分析. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2006]
- [18] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1989, 86: 6196—6200
- [19] 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 Research*, 1997, 25(24): 4876—4882
- [20] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny [J]. *Comput Appl Biosci*, 1996, 12: 543—548
- [21] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496—2497
- [22] 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
- [23] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150—163
- [24] Chen D Q, Zhang C L, Lu C, et al. Polymorphism of D-loop sequence from mitochondrial genomes of different broodstocks of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5): 800—806 [陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 青海湖裸鲤繁殖群体线粒体基因组 D-loop 区序列多态性. 中国水产科学, 2006, 13(5): 800—806]
- [25] Zhao L L, Zhao J L, Cao Y. Genetic Differentiation of the Mitochondrial DNA Control Region of *Siniperca obscura* from Minjiang River and Lijiang River [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(1): 54—58 [赵丽丽, 赵金良, 曹阳. 闽江和漓江暗鳉 mtDNA 控制区序列差异分析. 动物学杂志, 2007, 42(1): 54—58]
- [26] Yang J Q, Hu X L, Tang W Q, et al. mtDNA Control Region Sequence Variation and Genetic Diversity of *Coilia nasus* in Yangtze River Estuary and its adjacent waters [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43: 8—15 [杨金权, 胡雪莲, 唐

- 文乔, 等. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性. 动物学杂志, 2008, 43: 8—15]
- [27] Sun Y H, Wang W, Liu S Y, *et al.* Genetic Diversity Analysis of Mitochondrial D-loop Region of Chinese Sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(9): 787—790 [孙玉华, 王伟, 刘思阳, 等. 中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析. 遗传学报, 2002, 29(9): 787—790]
- [28] Song J. Population genetic diversity of rock carp (*Procypris rabaudi*) based on AFLP markers and mitochondrial DNA control region [D]. Thesis for Master of Science, Sichuan University, Chengdu. 2006 [宋君. 岩原鲤(*Procypris rabaudi*)种群遗传多样性研究. 硕士学位论文, 四川大学, 成都. 2006]
- [29] Yang B, Chen X Y, Yang J X. Structure of the Mitochondrial DNA Control Region and Population Genetic Diversity Analysis of *Anabarilius grahami* (Regan) [J]. *Zoological Research*, 2008, 29(4): 379—385 [杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鳊浪白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析. 动物学研究, 2008, 29(4): 379—385]
- [30] Chen D Q, Liu S P, Duan X B, *et al.* Preliminary study of the fisheries biology of main commercial fishes in the middle and upper reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(6): 618—622 [陈大庆, 刘绍平, 段辛斌, 等. 长江中上游主要经济鱼类的渔业生物学特征. 水生生物学报, 2002, 26(6): 618—622]
- [31] Li X F, Huang D M, Xie W X, *et al.* Status of fisher resources in the middle reaches of the Hanjiang River [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2005, 17(4): 366—374 [李修峰, 黄道明, 谢文星, 等. 汉江中游鱼类资源现状. 湖泊科学, 2005, 17(4): 366—374]
- [32] Jang G F, He X F. Status of Fish Resources in the Lower Reaches of the Jialing River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2008, 38(2): 3—7 [蒋国福, 何学福. 嘉陵江下游鱼类资源现状调查. 淡水渔业, 2008, 38(2): 3—7]
- [33] Duan X B, Chen D Q, Li Z H, *et al.* Current status of spawning grounds of fishes with pelagic eggs in the middle reaches of the Yangtze River after impoundment of the Three Gorges Reservoir [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(4): 523—531 [段辛斌, 陈大庆, 李志华, 等. 三峡水库蓄水后长江中游产漂流性卵鱼类产卵场现状. 中国水产科学, 2008, 15(4): 523—531]

MtDNA CONTROL REGION SEQUENCE VARIATION AND GENETIC DIVERSITY OF *COREIUS HETERODON* (BLEEKER) IN THE UPPER AND MIDDLE SECTIONS OF THE YANGTZE RIVER

YUAN Juan¹, ZHANG Qi-Zhong^{1,2}, LI Fei^{1,3}, ZHU Cheng-Ke¹ and LUO Fen⁴

(1. Key laboratory Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key laboratory of Aquatic science of Chongqing, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Central Laboratory of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 4. Biology Department, Ningde Teachers College, Fujian 352100, China)

Abstract: Brass gudgeon (*Coreius heterodon*) is an endemic species in China, and mainly distributes in the upper and middle sections of the Yangtze River. The fish population has been greatly decreased these years due to various factors, such as destruction of spawning condition, water pollution, over exploitation and so on. In order to protect the fish population, it is necessary to study genetic diversity of the fish population. The fish specimens were collected from 9 sampling locations in the upper and middle sections of the Yangtze River, i. e., Hechuan (HC), Mudong (MD), Fuling (FL), Wanzhou (WZ), Wushan (WS), Sandouping (SDP), Yichang (YC), Yueyang (YY) and Jinkou (JK). The specimen number was in Tab. 1. The mitochondrial D-loop region (control region) of the fish was amplified by polymerase chain reaction (PCR) technology and sequenced with ABI 3730 sequencer. 100 sequences were analyzed using some softwares, viz., Clustal X 1.83, MEGA 3.1, DnaSP 4.50.3 and Arlequin v3.01. The results were as follows:

Every specimen sequence was 946 bp for genetic diversity analysis of the fish. Both 47 mutations of nucleotide acids including 8 inserting or deleting ones and 41 haplotypes were found in the 100 sequences. About 34% of the 41 haplotypes presented at least in two or more geographic groups and every one of 27 haplotypes just appeared in single one of the 9 groups. The UPGMA tree and the Parsimony network of 41 haplotypes showed that the clustering of haplotypes did not correspond to every geographic group of the fish. Genetic structure analysis showed a low level genetic diversity of *C. heterodon* ($Hd=0.9257\pm0.0162$, $Pi=0.004178\pm0.002337$). The AMOVA analysis indicated that 99.66% of the total variation in D-loop region sequence came from nucleotide acid mutations of the fish individuals in the 9 geographic populations, and just 0.34% from variation between the 9 geographic populations, which showed little genetic differentiation between the 9 geographic groups. Meanwhile, average Kimura 2-parameter distances (Tab. 6), the F_{ST} value (Tab. 4) and Nm value (20.84) also revealed little genetic differentiation between the 9 geographic groups. All the data mentioned above indicated that the 9 geographic groups belonged to single nature population.

Key words: *Coreius heterodon* (Bleeker); Mitochondrial DNA D-loop region; Genetic diversity