

长江中上游银鮡线粒体 DNA 遗传多样性分析

王喆^{①②} 汪登强^① 段辛斌^① 陈大庆^① 陈会娟^③ 刘绍平^{①*}

① 中国水产科学研究院长江水产研究所 武汉 430223; ② 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;

③ 西南大学动物科技学院 重庆 400716

摘要: 银鮡 (*Squalidus argentatus*) 是长江常见小型鱼类, 分布广泛于干支流, 资源量较大。本研究采用线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素 *b* 基因序列对长江中上游干流江津、荆州、监利、洪湖、黄石江段及支流赤水河、湘江等 7 个江段共 217 尾银鮡样品的遗传结构和遗传多样性进行了分析。结果显示, 银鮡群体 Cyt *b* 基因序列分别检出了 81 个变异位点和 97 个单倍型, 平均单倍型多样性 (H_d) 和核苷酸多样性 (P_i) 分别为 0.966 和 0.008 6。分子方差分析 (AMOVA) 显示, 长江中上游银鮡群体存在显著遗传分化。群体间两两比较分析发现, 赤水河群体与其他群体基因交流程度低, 遗传分化显著, 其他群体间没有显著遗传分化。中性检验结果不支持银鮡历史上发生过群体扩张。

关键词: 银鮡; 遗传结构; 细胞色素 *b* 基因; 遗传多样性; 长江流域

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 04-615-07

Genetic Diversity of *Squalidus argentatus* in the Middle and Upper Reaches of the Yangtze River Inferred from Mitochondrial DNA Sequences

WANG Zhe^{①②} WANG Deng-Qiang^① DUAN Xin-Bin^① CHEN Da-Qing^①
CHEN Hui-Juan^③ LIU Shao-Ping^①

① *Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223;* ② *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;* ③ *College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China*

Abstract: *Squalidus argentatus* is a common freshwater fish distributed in Yangtze River, including in the main and tributary river. In this study, the genetic diversity and structure of *S. argentatus* from the upper and middle Yangtze River were analyzed using mitochondrial DNA Cyt *b* gene sequence. A total of 217 individuals were collected from 7 sampled sites, including Jiangjin, Jingzhou, Jianli, Honghu and Huangshi in Yangtze River, and Chishui in Chishui River and Yingtian in Xiangjiang River, the two tributaries of Yangtze River. A total of 81 polymorphic sites and 97 haplotypes were detected and the average haplotype diversity

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 51579247) 和农业部物种保护项目长江中上游重要渔业水域主要经济物种产卵场及洄游通道调查项目;

* 通讯作者, E-mail: lsp@yif.ac.cn;

第一作者介绍 王喆, 女, 硕士研究生; 研究方向: 渔业资源与环境; E-mail: wangzhe1914@126.com.

收稿日期: 2017-05-24, 修回日期: 2018-01-08 DOI: 10.13859/j.cjz.201804012

(H_d) and average nucleotide diversity (P_i) were 0.966 and 0.008 6, respectively (Table 1). Analysis of molecular variance (AMOVA) suggested that significant genetic differentiation occurred between the Chishui population and the others, and no genetic divergences among the latter six populations were found by pairwise AMOVA analysis (Table 3). The neutral test showed that historical population expansion did not occur in *S. argentatus* (Fig. 3).

Key words: *Squalidus argentatus*; Genetic structure; Cyt *b*; Genetic diversity; Yangtze River

银鮡 (*Squalidus argentatus*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鮡亚科 (Gobioninae), 分布于东亚地区, 包括朝鲜、日本、中国大陆及台湾、越南等, 栖息于水体中下层, 主要摄食水生昆虫, 其次为藻类和水生高等植物, 是一种在小型渔获物中占有较大比重 (30%左右) 的鱼类 (李修峰等 2005)。银鮡分布广泛, 适应能力强, 是研究生物地理学的良好模式生物。同时, 银鮡为产漂流性卵鱼类, 其产卵需要在流水环境中进行, 受精卵随流水漂流发育至能自主游泳幼鱼, 因此易受水电工程建设的影响 (段辛斌等 2015), 研究银鮡的遗传多样性对评估水电工程对水生动物影响以及河流生物多样性保护有重要意义。

目前对银鮡的研究主要在集中在资源调查 (李修峰等 2006, 吴金明等 2010a, 刘良国等 2013) 和繁殖生物学等 (李修峰等 2005, 王芊芊等 2010) 方面, 在群体遗传学方面仅见采用微卫星和 *mpS7* 标记的银鮡种群遗传结构 (孙杨 2012), 采用微卫星和线粒体 DNA 对我国东南沿海一些河流、台湾地区和长江中下游部分支流银鮡遗传结构 (Yang et al. 2012) 进行的研究。这些研究均发现银鮡存在显著的地理群体遗传分化, 但在资源丰富的长江中上游地区还没有见到相关报道。

本研究采用 DNA 测定技术测定长江中上游干流及赤水河、湘江等支流银鮡线粒体 DNA Cyt *b* 序列, 比较分析银鮡群体遗传多样性状况及不同江段群体遗传结构的差异性, 为银鮡的开发和保护以及人类活动对其种质资源的影响评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于 2015 年 5~7 月和 2016 年 5~7 月在长江中上游干流江津、荆州、监利、洪湖、黄石江段及支流赤水河、湘江等 7 个江段取样, 用无水乙醇保存并带回实验室。本研究采集银鮡 217 尾, 各采样点样本数量及采样点地理信息见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取

用酚-氯仿法提取基因组 DNA (Kocher et al. 1989), 用琼脂糖凝胶电泳检测提取基因组 DNA 效果。

1.3 PCR 扩增及测序

采用线粒体 DNA 细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列对样本进行分析。扩增 Cyt *b* 基因片段的引物序列 (Okazaki 1999) 为 L14724 (5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TG-3') 和 H15915 (5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3')。PCR 的反应总体积为 50 μ l, 其中, 10 \times Buffer (Mg^{2+}) 5 μ l、*Taq* 酶 (5 U/L) 0.4 μ l、dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μ l、10 mmol/L 引物各 2 μ l、模板 DNA 45~60 ng, 灭菌双蒸馏水补至 50 μ l。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 6 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增效果好的 PCR 产物送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测序引物与扩增引物相同。

1.4 数据分析

采用 Lasergene v7.1 对测序结果进行序列校对。用 MEGA 6.0 分析软件统计序列的平均

碱基组成, 并构建基于 K2-P 的邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树 (Tamura et al. 2013)。

用 DnaSP 5.0 软件 (Rozas et al. 2003) 计算核苷酸变异位点、单倍型数、单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数、Tajima's D 中性检验和核苷酸错配分布。用 Network 5.0.0.1 软件构建中值连接 (median-joining, MJ) 网络结构。

用 Arlequin ver 3 软件中的分子方差分析方法 (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) 估算遗传变异在群体间的分布及遗传变异固定指数 (F_{st}) 和群体内的分布及遗传变异固定指数, 1 000 次重复随机抽样重排后进行显著性检验。种群间基因流 (N_m) 由公式 $N_m = (0.5/F_{st}) - 0.5$ 计算得出 (Nei 1982)。

2 结果

2.1 群体遗传多样性分析

本研究获得银鮡线粒体 Cyt *b* 696 bp 的序列, T、C、G、A 平均碱基组成为 29.83%、28.79%、15.21% 和 26.17%, T + A 含量 (56.00%) 明显高于 G + C (44.00%), 表现出明显的反 G 偏倚, 显示鱼类 Cyt *b* 基因的共同特征。217 条序列中共发现 81 个变异位点, 其中, 66 个简约信息位点, 15 个单变异位点。217 个个体中, 共定义了 97 个单倍型。

群体遗传多样性参数见表 1, 银鮡单倍型

多样性 0.918 ~ 0.985 之间, 平均为 0.966, 核苷酸多样性在 0.007 0 ~ 0.008 8 之间, 平均为 0.008 6。群体间遗传多样性大小差异不大。

在银鮡 217 尾样本中共检测到 97 个单倍型, 其中 H_43、H_25、H_23 和 H_4 具有较高的检测频率, 分别是 11.5%、9.6%、7.3% 和 6.4%。这 4 个单倍型中没有一个是所有群体共享的, H_23 为 5 个群体共享, 其余 3 个单倍型为 6 个群体共享, 此外还有 17 个单倍型为 2 ~ 4 个群体共享 (图 1)。

2.2 单倍型系统发育及 Network 网络关系

为了比较本研究的银鮡 Cyt *b* 单倍型与 Yang 等 (2012) 结果中划分的遗传谱系关系, 我们将 Yang 等 (2012) 全部序列与本研究结果重构 NJ 系统发育树 (图 1), 以点纹银鮡 (*S. wolterstorffi*, GenBank No. AP011392)、兴凯银鮡 (*S. chankaensis biwae*, GenBank No. LC098214)、吻鮡 (*Rhinogobio typus*, GenBank No. NC024423) 为外类群, 结果显示, 本研究所有单倍型序列与 Yang 等 (2012) 结果中划分的 Lineage A 聚在一起, 与 Lineage B (图 1) 分开, 没有发现新的遗传谱系。此外, 我们发现, 赤水群体除了单倍型 H_15 外, 均聚在一个分支上, 单倍型 H_35、H_36、H_66、H_91 形成一个较明显的单系。其他 6 个群体分散于各分支上。

通过中值连接法构建的银鮡单倍型 Network

表 1 银鮡 mtDNA Cyt *b* 群体遗传多样性

Table 1 Genetic diversity parameters for mtDNA Cyt *b* of *Squalidus argentatus* populations

种群 Population	样品数 Number of sample	单倍型 Number of haplotype (<i>h</i>)	变异位点数 Number of polymorphic sites (<i>S</i>)	单倍型多样性 Haplotype diversity (H_d)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (P_i)
赤水 Chishui	28	18	32	0.918	0.008 8
江津 Jiangjin	51	35	51	0.980	0.008 3
荆州 Jingzhou	36	24	35	0.962	0.007 0
湘江 Xiangjiang	28	14	27	0.921	0.007 3
洪湖 Honghu	22	18	30	0.978	0.008 3
黄石 Huangshi	12	11	20	0.985	0.008 2
监利 Jianli	40	23	37	0.940	0.007 2
总计 Total	217	97	81	0.966	0.008 6

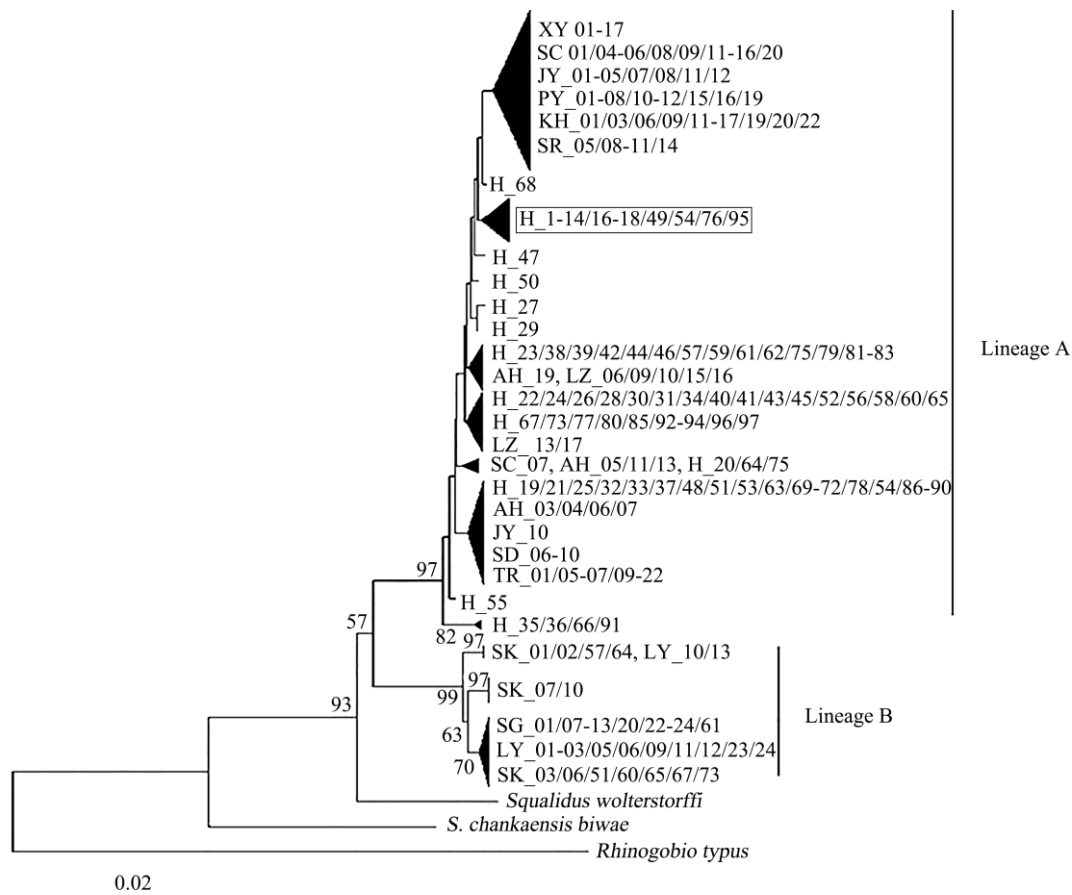


图 1 银鮠细胞色素 *b* 基因单倍型邻接树

Fig. 1 Neighbor-joining tree of haplotypes of mtDNA Cyt *b* gene in *Squalidus argentatus*

以点纹银鮠、兴凯银鮠和吻鮠为外群，分支上的数字为 1 000 次重复抽样的自检值。H₁ ~ H₉₇ 为本研究单倍型，其余为 Yang 等 (2012) 的数据。方框示赤水群体主要单倍型。

S. wolterstorffi, *S. chankaensis biwae* and *Rhinogobio typus* were used as outgroup, and numbers at the nodes indicate bootstrap values with 1 000 replicates. H₁ - H₉₇ were the haplotypes in this study and the rest were those of Yang et al. (2012). Haplotypes in frame come from population of Chishui.

网络连接结构 (图 2), 显示这些序列主要以出现频率最高的 4 个单倍型, 即 H₄ 与 H₂₃、H₂₅ 和 H₄₃ 为中心, 其余大部分单倍型围绕它们连接。观察发现, 单倍型 Network 网络连接结构图左上角部分 (图 2, 组 I) 主要是由来自赤水的样本组成, 剩余区域没有明显地理区别。

2.3 遗传分化和基因流

AMOVA 分析结果显示 (表 2), 总的群体间 $F_{st} = 0.1032$ ($P < 0.05$), 表明群体间存在内

部遗传分化。进一步对群体间两两配对 AMOVA 分析 (表 3), 显示赤水群体与其他群体的 F_{st} 均大于 0.25, 而其余 6 个群体间的 F_{st} 均低于 0.05, 提示赤水群体与其他群体存在显著的遗传分化, 其余群体之间没有显著分化。

基因流分析显示 (表 3), 赤水群体与其他 6 群体之间的基因流低于 1.5, 后者之间基因流高于 13 或为负值, 提示赤水群体与其他群体基因交流少, 其他 6 个群体之间基因交流较频繁。

2.4 历史种群动态

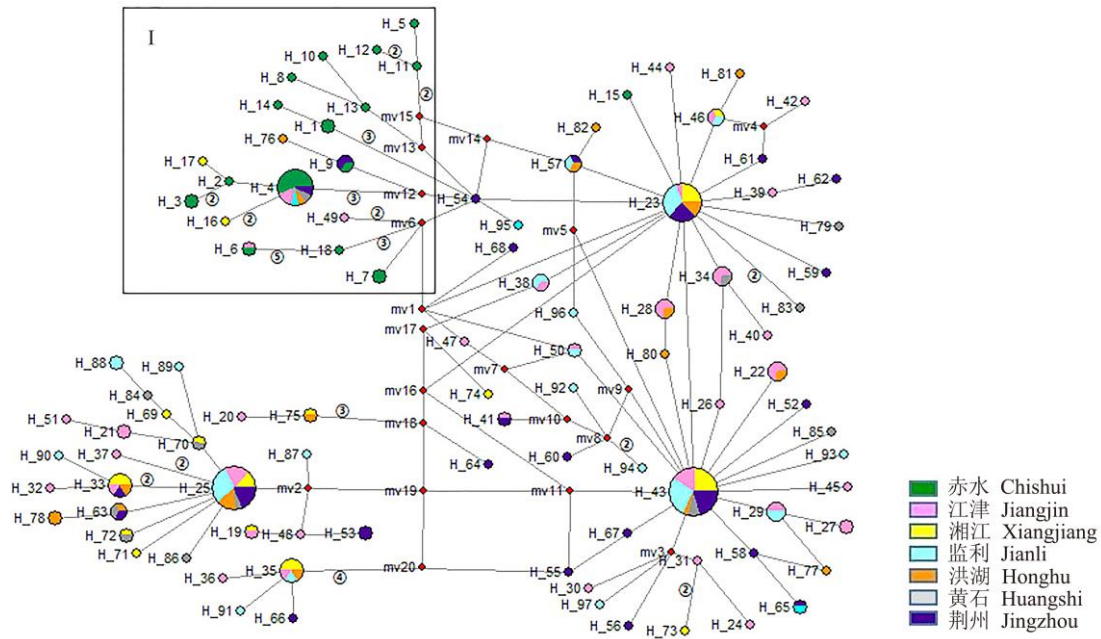


图 2 银鮡线粒体 Cyt b 的中值连接法 Network 连接网络图

Fig. 2 Median-joining network for *Squalidus argentatus* constructed from mtDNA Cyt b sequences

不同颜色表示不同群体，圆的面积代表单倍型频率，连线上圆圈内数字表示突变步数；方框 I 组示赤水群体所在的位置。

The different colour shades refer to the different populations, sizes of circles indicates frequencies of haplotype and number in circles on the lines present mutant numbers. Group I marked in frame indicated position of samples of Chishui population.

表 2 银鮡群体分子方差分析

Table 2 Analysis of molecular variance (AMOVA) among populations of *Squalidus argentatus*

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	方差变量 Variance components	变异百分比 (%) Percentage of variation
群体间 Among populations	6	72.757	0.309 16	10.17
群体内 Within populations	211	576.183	2.730 73	89.83

表 3 银鮡群体间遗传变异系数 (F_{st} , 下三角中数据) 和基因流 (N_m , 上三角中数据)

Table 3 Pairwise F_{st} (lower triangle) and associate N_m (upper triangle) among populations of *Squalidus argentatus*

群体 Population	赤水 Chuishui	江津 Jiangjin	荆州 Jingzhou	湘江 Xiangjiang	洪湖 Honghu	黄石 Huangshi	监利 Jianli
赤水 Chuishui		1.416 7	1.402 1	0.970 5	1.460 0	1.191 5	1.163 3
江津 Jiangjin	0.260 9**		- 5.946 6	21.801 5	- 109.195 6	23.207 9	- 66.725 2
荆州 Jingzhou	0.262 9**	- 0.009 2		14.363 3	- 96.102 3	13.604 4	- 40.757 6
湘江 Xiangjiang	0.340 0**	0.022 4	0.033 6		- 2.273.227 3	- 24.400 6	35.943 2
洪湖 Honghu	0.255 1**	- 0.004 6	- 0.005 2	- 0.000 2		- 35.030 4	- 22.722 2
黄石 Huangshi	0.295 6**	0.021 1	0.035 5	- 0.020 9	- 0.014 5		33.911 6
监利 Jianli	0.300 6**	- 0.007 6	- 0.012 4	0.013 7	- 0.002 3	0.014 5	

** $P < 0.01$.

对银鮡进行碱基错配和中性检验, 讨论其群体是否经历过群体扩张的模式。总样本的碱基错配分析呈现一个多峰型的图形(图 3), Fu and Li's D 值为 -0.82023 ($P > 0.10$), Tajima's D 值为 -1.78910 ($P < 0.05$), 不支持其群体近期发生过种群扩张。

3 讨论

3.1 银鮡的遗传多样性

长江中上游银鮡遗传多样性水平与 Yang 等(2012)的银鮡样本结果相似。与长江其他鱼类, 如铜鱼(*Coreius heterokon*, $H_d = 0.849$) (袁希平等 2008)、长薄鳅(*Leptobotia elongate*, $H_d = 0.609$) (田辉伍等 2013)、鳊(*Parabramis pekinensis*, $H_d = 0.930$) (陈会娟等 2016) 相比, 银鮡遗传多样性也处于较高水平, 说明长江银鮡群体遗传多样性水平较高, 这可能是银鮡分布广泛、适应能力强、种群数量庞大的原因。尽管银鮡产漂流性卵, 但近期一些研究表明, 三峡大坝截流后, 长江上游及赤水河银鮡资源反而有上升趋势(黎良等 2015), 可能存在捕食者或同生态位竞争者减少

等的因素, 但也表明银鮡对环境改变具有较强的适应能力, 这种能力也体现在较高的遗传多样性水平上。

3.2 银鮡的遗传结构

银鮡群体 AMOVA 结果显示, 赤水河群体与其他群体存在显著的遗传分化, 由于赤水河群体与江津群体的距离小于江津至长江中游及湘江各群体的距离, 分化的产生不是地理隔离所导致, 并且江津江段和赤水江段间无水坝分割, 江津与长江中游存在三峡和葛洲坝的隔离。从 NJ 树看, 赤水河群体除了 1 尾样本(Hap_15)外, 都是聚在一起与少数其他群体的个体形成一个单系群(图 1, 框内分支), 从 Network 网络结构上看, 赤水河群体几乎独占组 I, 这个组的单倍型与其他单倍型之间的连接至少需要一个缺失单倍型来过渡(图 2), 表明赤水河银鮡群体是一个相对封闭的群体, 与其他群体交流较少。赤水河的水生态系统对银鮡而言可能是一个异于长江干流以及湘江等支流的环境, 银鮡在赤水河形成了局域特异群体。

3.3 银鮡的种群历史

错配分布分析和中性检测不能提示银鮡长

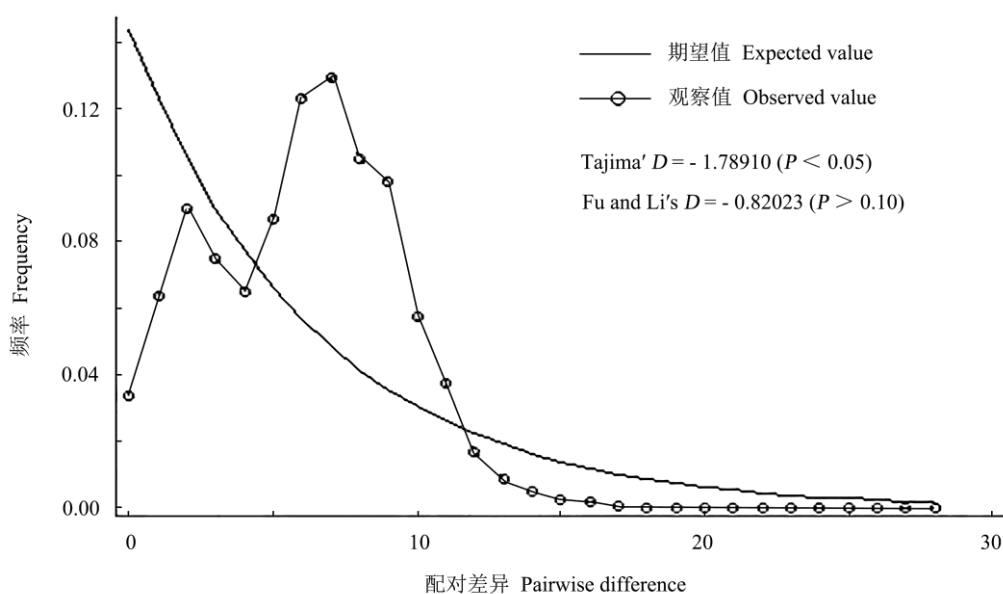


图 3 银鮡群体线粒体 DNA Cyt b 碱基错配分析及中性检验

Fig. 3 The mismatch distribution and neutral test of *Squalidus argentatus* mtDNA Cyt b

江中上游的群体曾经历过种群扩张,这与长江其他鱼类,如长薄鳅(田辉伍等 2013)、鲇鱼(*Silurus asotus*, 肖明松等 2013)等不同,长江不少鱼类受冰期影响,经历了遗传瓶颈和群体扩张(范启等 2014)。根据本研究分析,冰期对长江银鮡群体似乎没有影响很大,群体较为稳定,与中国东南沿海群体的研究结果(Yang et al. 2012)一致,反应了银鮡对环境变化具有较高的适应能力。

3.4 保护建议

保护好长江及其流域内各支流和湖泊中鱼类的遗传多样性是我国重要的渔业管理政策。河流水电工程开发对渔业资源产生重大影响,对鱼类遗传结构变化产生明显作用。赤水河是长江上游唯一一条未在干流筑坝的一级支流,保有较好的原生态系统(吴金明等 2010b)。本研究发现赤水河银鮡群体与长江其他群体存在显著遗传分化,提示我们在渔业管理实践中,赤水河银鮡群体应作为一个管理单元加以保护。2017年起,赤水河全河段全年禁渔,在长江流域水生生物保护区实现全面禁捕,实行以封禁为主的自然恢复措施,辅以人工修复,改善和提升生态功能,建议将长江禁渔期延长,禁渔范围扩大至全流域,这对赤水河银鮡乃至长江所有鱼类种质资源保护具有重要意义。

本文对长江中上游银鮡的群体遗传多样性问题进行了初步探讨,今后还需要采用更多样本,运用其他标记,如微卫星等进一步研究。

参 考 文 献

- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479–491.
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16): 6196–6200.
- Nei M. 1982. Evolution of human races at the gene level// BonneT B, Cohen T, Goodman R M, et al. *Human Genetics. Part A: the*
- Unfolding Genome. New York: Alan R Liss, 167–181.
- Okazaki T. 1999. Genetic relationships of Japanese and Korean Bagrid catfishes inferred from mitochondrial DNA analysis. *Zoological Science*, 18(6): 570–573.
- Rozas J, Sánchez-Delbarrio J C, Messeguer X, et al. 2003. Dna SP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18): 2496–2497.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Yang J Q, Tang W Q, Liu D, et al. 2012. Phylogeographical analysis on *Squalidus argentatus* recapitulates historical landscapes and drainage evolution on the Island of Taiwan and Mainland China. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2): 1405–1425.
- 陈会娟, 汪登强, 段辛斌, 等. 2016. 长江中游鳊群体的遗传多样性. *生态学杂志*, 35(8): 2175–2181.
- 段辛斌, 田辉伍, 高天珩, 等. 2015. 金沙江一期工程蓄水前长江上游产漂流性卵鱼类产卵场现状. *长江流域资源与环境*, 24(8): 1358–1365.
- 范启, 何舜平. 2014. 长江流域鳊种群遗传多样性和遗传结构分析. *水生生物学报*, 38(4): 627–635.
- 黎良, 袁维林, 刘飞. 2015. 赤水河赤水市江段鱼类资源现状. *长江流域资源与环境*, 24(11): 1884–1890.
- 李修峰, 黄道明, 谢文星, 等. 2005. 汉江中游银鮡的胚胎发育. *大连海洋大学学报*, 20(3): 181–185.
- 李修峰, 黄道明, 谢文星, 等. 2006. 汉江中游产漂流性卵鱼类产卵场的现状. *大连海洋大学学报*, 21(2): 105–111.
- 刘良国, 杨品红, 杨春英, 等. 2013. 湖南境内澧水鱼类资源现状与多样性研究. *长江流域资源与环境*, 22(9): 1165–1171.
- 孙杨. 2012. 基于微卫星和 *rpS7* 标记的银鮡种群遗传结构与系统发育地理研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 田辉伍, 段辛斌, 汪登强, 等. 2013. 长江上游长薄鳅 *Cyt b* 基因的序列变异与遗传结构分析. *淡水渔业*, 43(6): 13–28.
- 王芊芊, 吴金明, 张富铁, 等. 2010. 赤水河银鮡的早期发育与仔鱼的耐饥饿能力. *动物学杂志*, 45(3): 11–20.
- 吴金明, 王芊芊, 刘飞, 等. 2010a. 赤水河赤水段鱼类早期资源调查研究. *长江流域资源与环境*, 19(11): 1270–1276.
- 吴金明, 赵海涛, 苗志国, 等. 2010b. 赤水河鱼类资源的现状与保护. *生物多样性*, 18(2): 162–168.
- 肖明松, 崔峰, 康健, 等. 2013. 淮河野生鲇鱼线粒体 *Cyt b* 基因的序列变异与遗传结构分析. *动物学杂志*, 48(1): 75–86.
- 袁希平, 严莉, 徐树英, 等. 2008. 长江流域铜鱼和圆口铜鱼的遗传多样性. *中国水产科学*, 15(3): 377–386.