

doi: 10.7541/2013.90

长吻鲩养殖群体与野生群体遗传多样性分析

肖明松 崔峰 康健 马玉涵

(安徽科技学院生命科学学院, 凤阳 233100)

摘要:长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)是中国土著珍稀鱼类。近年来,由于江河水利工程、环境污染及人类生产活动已经对江河的渔业资源造成了难以逆转的破坏,长吻鲩的渔业资源已逐渐枯竭。目前,长吻鲩在四川、广东等地实现适度规模养殖。以四川眉山、湖北石首和安徽淮南3个人工养殖长吻鲩群体及4个长江野生长吻鲩群体(重庆段、武汉段、安庆段和南京段)为实验材料,利用线粒体DNA(mtDNA)控制区序列作为分子标记对135个个体的遗传结构进行了分析。结果表明,在790 bp的同源序列中,长吻鲩3个养殖种群共检测到变异位点27个,占全部序列的3.42%,66个个体共检测到18种单倍型;在野生群体中,69个个体共检测到35个变异位点和36个单倍型,长吻鲩野生群体平均单倍型多样性和平均核苷酸多样性($Hd = 0.9736 \pm 0.0070$, $Pi = 0.0087 \pm 0.0015$)高于长吻鲩养殖群体($Hd = 0.8867 \pm 0.0013$, $Pi = 0.0056 \pm 0.0013$);群体间的遗传分化水平较低(F_{st} 值为0.0014—0.1125)。采用邻接法(NJ法)和统计简约原理对所有单倍型进行系统发育树和统计简约网状图的构建,结果表明:各群体内的个体均不能分别构成独立的分支,而是相互交叉聚在一起。分析结果表明,长吻鲩养殖群体与野生群体之间的基因交流充分,未出现遗传分化,但相对长吻鲩野生群体,长吻鲩养殖种群多态性偏低。

关键词:长吻鲩; mtDNA; 控制区; 序列分析

中图分类号: Q346 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)01-0090-10

长吻鲩(Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* Günther) 隶属鲶形目(Siluriformes)、鲶科(Bagridae)、鲶属(*Leiocassis*), 俗称: 鲶鱼、江团、肥沱、肥王鱼、灰江团鱼等, 为我国鲶形目分布最广且产量较高的特产淡水名贵经济鱼类。其肉质细嫩、肉味鲜美且无细刺, 尤其是鱼鳔特别肥厚, 含大量的胶原蛋白, 是高级滋补品, 与燕窝、鱼翅齐名, 被视为肴中珍品, 自古作为贡品之用, 也是一种贵重药材。长吻鲩分布于中国东部的辽河、淮河、长江、闽江至珠江等水系及朝鲜西部, 以长江水系为主。近年来, 由于江河水利工程、环境污染、人类生产活动对自然资源的无节制掠夺等对江河的渔业资源造成了难以逆转的破坏, 长吻鲩的渔业资源已逐渐枯竭。为促进长吻鲩繁殖和养殖迅速发展, 四川、

广东等地已获得适度规模养殖^[1-4]。目前, 有关长吻鲩生物学、生态学及养殖技术方面的研究有大量资料报道^[5-8], 但与其相关的遗传方面的研究则较少, 仅在染色体组型、同工酶、微卫星引物筛选等方面有报道^[9-12]。长吻鲩作为一个优良的养殖种类, 有必要对其种质及遗传多样性进行深入了解。鱼类线粒体DNA(mtDNA)具有分子小、结构简单、母系遗传、进化速度快、几乎不发生重组、不同区域进化速度存在差异等特点, 是一个相对独立的复制单位。一个个体就代表一个母系集团, 便于进行群体分析。已被广泛地应用于类群识别、地理隔离、起源、分化和扩散、遗传多样性等领域^[13-17]。本研究利用 mtDNA 技术在分子水平上对来自安徽、湖北、四川 3 省长吻鲩的养殖群体和长江野生群体进行遗

收稿日期: 2012-02-09; 修订日期: 2012-09-05

基金项目: 安徽省教育厅重点科研项目(KJ2011Z069); 安徽科技学院稳定人才项目(ZRC2011257); 安徽科技学院预研项目(ZRC2012312)资助

通信作者: 肖明松(1973—), 男, 安徽定远人; 副教授, 博士; 主要从事渔业生态和分子进化研究。E-mail: xiaomingsong2004@126.com

传分析,试图了解天然群体和人工繁殖群体的遗传结构以及遗传多样性,以评价其种质状况,为种质资源研究、人工养殖及品种培育提供相关的遗传背景资料 and 理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验鱼 长吻鮠 3 个养殖群体分别来自四川眉山市长吻鮠原种场的子一代(22 个个体,2010 年 11 月取样)、湖北省石首市长吻鮠原种场的子一代(16 个个体,2010 年 12 月取样)、安徽省淮南市特种水产养殖场(28 个个体,2010 年 11 月取样),均为 1—2 龄的鱼种,体长 8.0—30.6 cm;体重 16.8—351.5 g,长吻鮠长江野生群体分别来自重庆段(23 个个体,2008 年 8 月取样)、武汉段(15 个个体,2008 年 8 月取样)、安庆段(16 个个体,2008 年 10 月取样)和南京段(15 个个体,2008 年 10 月取样),均为 2—3 龄的鱼种,体长 31.5—60.2 cm,体重 269.5—624.7 g(表 1)。标本采用 95%乙醇固定,−20℃保存在安徽科技学院。

主要试剂 蛋白酶 K、琼脂糖、饱和酚购自上海生工生物工程技术有限公司,引物 DL1 (5'-ACCCCTGGCTCCCAAAGC-3') 和 DH2 (5'-ATCTTAGCATCTTCAGTG-3')^[18]由上海生工生物工程技术有限公司合成, *Taq* 酶、dNTPs 购自大连 TaKaRa 公司;其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器 PCR 仪、核酸分析仪和离心机为 Eppendorf (德国), Alphasizer Is-2200 凝胶图像分析系统(美国),电泳仪等常规仪器均为国产。

1.2 方 法

模板 DNA 的制备 每个样品随机取肌肉 100—200 mg,剪碎,匀浆后置于 1.5 mL 的微量离心管中,加入含蛋白酶 K 的裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1%SDS), 55℃消化过夜。次日分别用 Tris-饱和酚、氯仿/异戊醇(24:1)提取、纯化 DNA,之后用−20℃冷冻的无水乙醇沉淀 DNA,自然干燥后,溶于灭菌双蒸水中,所得用基因组 DNA 样品用紫外分光光度计测量 DNA 样品的浓度和纯度,同时辅以琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性并估测分子量,置于−20℃冰箱保存备用。

PCR 反应 PCR 反应总体积为 30 μL,其中含 10×buffer 反应缓冲液 3.0 μL, 3 μL dNTP

(2.5 mmol/L), 0.4 μmol/L 引物, 0.25 μL *Taq* 酶, 25 ng DNA, 用灭菌双蒸馏水补足体积。PCR 反应条件为: 94℃下预变性 5min, 94℃下变性 30s, 58℃下退火 1min, 72℃下延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72℃下延伸 10min, 4℃保存。

琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 g/mL EB) 上电泳, 120 V 稳压电泳 1h。电泳结果在 Alphasizer Is-2200 凝胶图像分析系统中拍照、保存。

DNA 序列测定和分析 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将 PCR 产物送往上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定, 测得的序列用 Clustal X 1.81 程序^[19]进行比对, 并辅以人工校对, 进行同源性比较。所有序列均递交 GenBank (序列号为 JN131500-JN131517 和 AB054127-AY297099)。利用 MEGA 3.0 软件包^[20]分析序列特征、统计碱基组成和转换与颠换值、计算遗传差异和遗传距离。采用邻接法(Neighbor-joining tree, NJ)构建分子系统发育树, 系统树各分支的置信度由 1000 次自举法(Bootstrap)检验。利用 DnaSP 4.0 软件^[21]计算各群体的单倍型多样性(*H*)、平均核苷酸差异数(*K*)、核苷酸多态性(*Pi*); Arlequin 3.1 软件^[22]进行群体间的欧氏距离平方(Squared euclidean distance) 矩阵分子变异分析(AMOVA), 统计长吻鮠养殖群体与野生群体间的遗传分化指数(F_{st}), 并根据 $Nm \approx (1-F_{st})/(2F_{st})$ 得到群体间的基因流值(N_m)。为进行谱系生物地理学(Phylogeography)分析, 利用 TCS 1.21^[23]软件, 依据统计简约原理^[24], 构建单倍型的网状图。相对于传统的系统发育分析方法, 网状图更能够有效地揭示种群水平上的谱系关系(Genealogical relationship), 更清楚地反映与种内基因进化有关的特性, 如是否保持祖先的单倍型、是否存在多重后代的单倍型以及种群间的序列差异较低的特性^[25]。

2 结 果

2.1 长吻鮠线粒体控制区序列变异、单倍型和单倍型分布

利用引物 DL1 和 DH2 从所有长吻鮠个体的总 DNA 中均成功扩增出 790 bp 的线粒体控制区序列片段。在长吻鮠养殖群体所有可比较的 790 bp 序列中, 66 个个体共检测到 27 个变异位点(占全部碱基数的 3.42%)。其中简约信息位点 18 个, 单突变位点

续表 1

单倍型 Haplotype	地点 Situation										合计	
	眉山	石首	淮南	重庆	武汉	安庆	南京					
H-25	11	11111233333	44555666666	66666666666	66666666666	77		1				1
H-26	TC.	.G..C.C.T.	.A.....A.....				1			1
H-27	TC.C.T.	.A.....			3				3
H-28	TC.C.C.T.	.A.....		2	1				3
H-29	TC.C.C.G.	.A.....T.			2	1			3
H-30	TC.C.C..	.A.....					3		3
H-31	TC.	.G..C.C.C..	TA.....					3		3
H-32	TC.C.C..	TA.....				1	2		3
H-33	TC.C.C..	TA.....				1			1
H-34	TC.C.C.C.T.	TA.....				1			1
H-35	TC.C.C.C.T.	TA.....		4	1				5
H-36	TC.C.C.C.T.A.....T.....			1				2
H-37	TC.C.C.C.T.		5				1	6
H-38	TC.C.C.C.T.G				2	1		3
H-39	TC.G.C.T.						1	1
H-40	TC.C.C.T.						1	1
H-41	TC.C.C.T.					1		1
H-42	TC.C.C.T.G.....A.....				2	1		3
H-43	TC.C.....C.....			1				1
H-44	TC.C.....A.A..-CT..C...			1	2	1		4
H-45	TC.C.....A.A..-CT..CC...				1	1	1	2
H-46	TC.C.....A.A..-CT..CC...				1			1
H-47	TC.C.....A.A..-CT..C...				1			1

注: 圆点(.)表示与 H-1 有相同的碱基组成; 横线(-)表示碱基缺失

Note: A dot (.) indicates identity with H-1 sequence. Hyphens (-) indicate gaps

8 个, 缺失位点 1 个。含有 4 个转换位点(Ts), 1 个颠换位点(Tv), 平均转颠换比(Ts/Tv)为 8.27。在长吻鮠野生群体中, 69 个个体共检测到 35 个变异位点(占全部碱基数的 4.43%)。其中简约信息位点 24 个, 单突变位点 10 个, 缺失位点 1 个。含有 5 个转换位点(Ts), 1 个颠换位点(Tv), 平均转颠换比(Ts/Tv)为 9.80。在长吻鮠养殖群体和野生群体中, 135 个个体共检测到 42 个变异位点, 其中简约信息位点 28 个, 单突变位点 12 个, 缺失位点 2 个(表 1)。长吻鮠养殖群体和野生群体的碱基变化不大(表 2), 其中碱基 G 的含量显著低于其他碱基的含量, A+T 含量(60.6%)明显高于 C+G 含量(39.4%)。

2.2 单倍型分布及单倍型聚类分析

利用 DnaSP 4.0 软件计算各群体的单倍型(表 1)。由表 1 可知, 在长吻鮠不同群体中, 135 个个体共检测出 46 个单倍型, 即 H-1 - H-46。其中 28 个独享单倍型, 占 20.74%, 18 个共享单倍型, 单倍型 H-8、H-11、H-12、H-14、H-18、H-24、H-37 和 H-43 为野生群体和养殖群体共享。另外, 在长吻鮠养殖群体中, 66 个个体共检测出 18 个单倍型, 在野生群体中 69 个个体共检测出 36 个单倍型(表略)。TCS 1.21 软件生成的统计简约网状图显示出星状的分布态势, 没有将 46 个单倍型区分为对应不同地理区域或者地理种群的单系群。单倍型 H-14 位于星状图的中心, 其他单倍型则与其依短支相连(图 1)。依据溯祖理论 (Coalescence theory), 线粒体控制区单倍型的星状拓扑结构表明所研究

表 2 长吻鮠序列碱基组成

Tab. 2 Nucleotide compositions of mtDNA control region in *Leiocassis longirostris*

群体 Populations	T	C	A	G
眉山 Meishan	31.6	25.2	29.1	14.1
石首 Shishou	31.5	25.2	29.1	14.2
淮南 Huainan	31.5	25.3	29.0	14.2
平均 Average	31.6	25.2	29.0	14.2
重庆 Chongqing	31.5	25.3	29.1	14.1
武汉 Wuhan	31.5	25.3	29.1	14.1
安庆 Anqing	31.5	25.3	29.0	14.2
南京 Nanjing	31.5	25.3	29.1	14.1
平均 Average	31.5	25.3	29.1	14.1

的种群经历了明显的种群扩张^[26], 单倍型 H-14 由于其分布最广和享有该单倍型的个体在所有的种群中所占的比重也明显的高于其他单倍型, 而且在网状图中处于基部位置, 说明单倍型 H-14 可能是原始

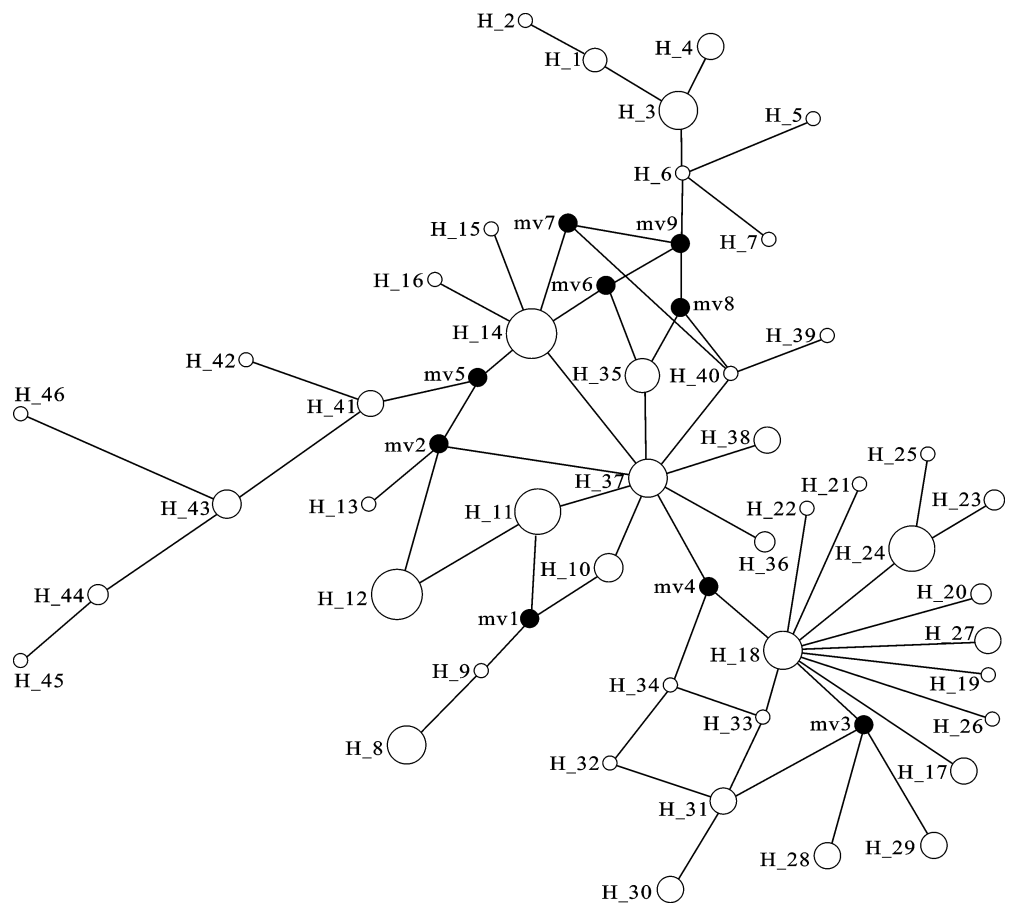


图 1 基于线粒体控制区单倍型的统计简约网状图

Fig. 1 The statistical parsimony network inferred from mtDNA control region haplotypes
白色圆形大小代表含有该单倍型的个体数量, 黑色圆点代表单倍型间的假定突变步骤

The area of circle or square is proportional to the number of observed individuals. Black dots represent putative mutational steps between haplotypes

的单倍型。

2.3 群体遗传多态性参数统计

利用 DnaSP 4.0 软件计算各群体的单倍型多样性(H_d)、平均核苷酸差异数(K)、核苷酸多态性(P_i)。由表 3 可知, 长吻鮠 4 个野生群体的单倍型多样性 H_d 值均较高, 而从衡量群体遗传水平的 K 值和 P_i 值来看, 重庆野生群体明显高于其他群体。长吻鮠 3 个养殖群体的平均单倍型多样性和平均核苷酸多样性相对较低 ($H_d = 0.8867 \pm 0.0013$, $P_i = 0.0056 \pm 0.0013$)。

2.4 群体遗传分化

群体间的序列差异反映的是生物间亲缘关系的远近, 使用 MAGA 3.0 软件中 Tamura-Nei 模型计算群体内及群体间的遗传距离(表 4)。结果表明, 四

川眉山和湖北石首人工养殖群体间的亲缘关系较远, 而安徽淮南养殖群体与湖北石首和四川眉山人工养殖群体间的亲缘关系较近, 长吻鮠养殖群体与野生群体存在一定的遗传距离。分子变异分析(AMOVA)的结果表明, 长吻鮠群体内存在较高的遗传变异(96.42%), 而群体间的遗传变异较小(3.21%) (表 5), 分子遗传变异主要来自地理区内群体内个体间。7 个群体两两比较的遗传分化指数(F_{st})显示, 安庆群体和石首群体之间的遗传分化最大($F_{st} = 0.1125$), 而武汉群体和安庆群体之间的遗传分化最小($F_{st} = 0.0014$), 其中长吻鮠养殖群体间的遗传分化高于野生群体间的遗传分化。此外, 群体间的遗传距离分析与遗传分化指数的分析结果是一致的(表 4)。Arlequin 3.1 软件统计养殖群体与野生群体间的遗

表 3 长吻鮠 7 个群体遗传多样性统计参数
Tab. 3 Demographic parameters estimated from seven *Leiocassis longirostris* populations

群体 Populations	单倍型多样性 H_d	平均核苷酸差异数 K	核苷酸多样性 P_i
眉山 Meishan	0.8972±0.0361	4.8854	0.0064±0.0013
石首 Shishou	0.8580±0.0570	4.3500	0.0049±0.0021
淮南 Huainan	0.9048±0.0260	4.9444	0.0056±0.0011
平均 Average	0.8867±0.0013	4.7266	0.0056±0.0013
重庆 Chongqing	0.9470±0.0320	6.5580	0.0083±0.0008
武汉 Wuhan	0.9810±0.0310	6.1520	0.0078±0.0007
安庆 Anqing	0.9170±0.0420	3.9580	0.0050±0.0006
南京 Nanjing	0.9430±0.0540	4.2860	0.0054±0.0007
平均 Average	0.9736±0.0070	5.3030	0.0087±0.0015

表 4 长吻鮠群体间的遗传分化指数(左下角)和遗传距离(右上角)
Tab. 4 Fixation Index (F) (below) and genetic distance (above) in three populations of *Leiocassis longirostris*

群体 Populations	眉山 Meishan	石首 Shishou	淮南 Huainan	重庆 Chongqing	武汉 Wuhan	安庆 Anqing	南京 Nanjing
眉山 Meishan	—	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.006
石首 Shishou	0.1024	—	0.005	0.007	0.007	0.006	0.006
淮南 Huainan	0.0391	0.0991	—	0.007	0.007	0.006	0.006
重庆 Chongqing	0.0600	0.0909	0.0654	—	0.008	0.007	0.007
武汉 Wuhan	0.0195	0.0691	0.0358	0.0086	—	0.007	0.007
安庆 Anqing	0.0683	0.1125	0.0514	0.0551	0.0014	—	0.006
南京 Nanjing	0.0335	0.0660	0.0036	0.0335	0.0016	0.0277	—

表 5 长吻鮠群体分子变异分析结果
Tab. 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the *Leiocassis longirostris* populations

遗传变异来源 Source of variation	自由度 Degrees of freedom	遗传变异元素 Variance components	占总变异百分比 Percentage of variance
地理区间 Among regions	1	0.0092	0.37
地理区内种群间 Among populations with regions	5	0.0798	3.21
种群内 Within populations	128	2.3942	96.42
总计 Total	134	2.4831	100

传分化指数和基因流分别为 $F_{st}=0.0358$ 、 $N_m=13.47$ 。

2.5 群体间的亲缘关系及聚类分析

利用 MEGA 4.0 构建长吻鲮线粒体控制区核苷酸序列的 NJ 分子系统树(图 2)。由图 2 和表 3 可知,各野生群体和养殖群体内的个体均未单独成群,而是互有交叉,表明各野生群体和养殖群体的遗传相似性系数较高,亲缘关系较近。

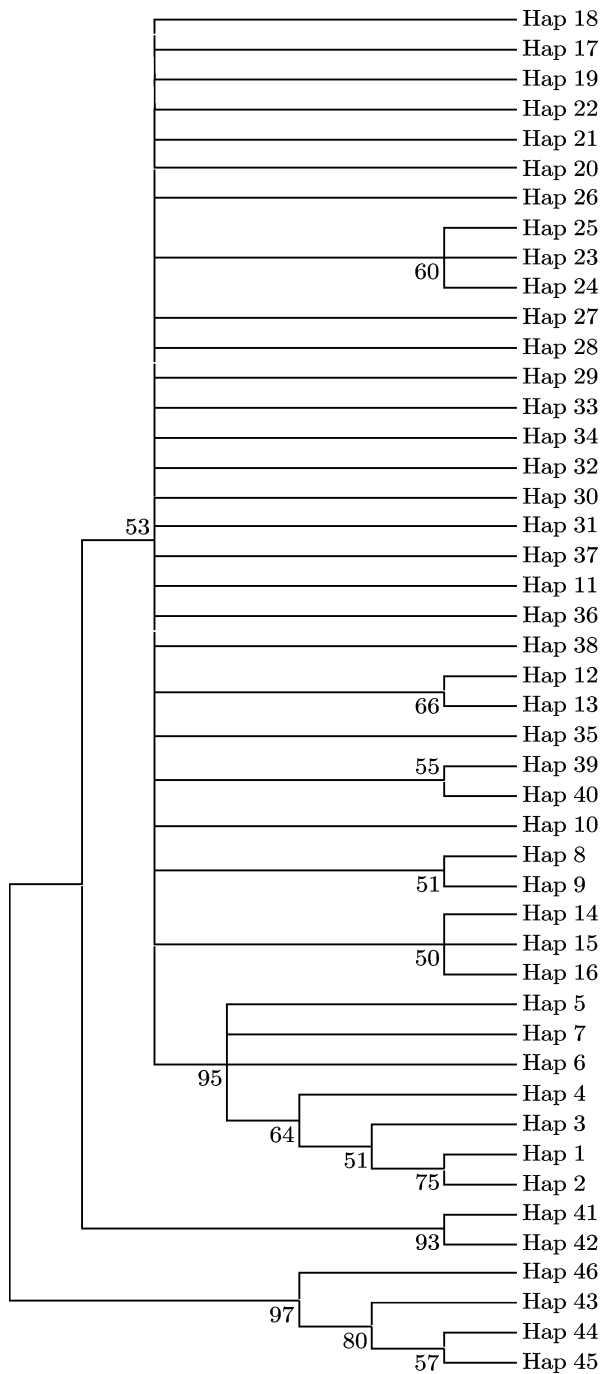


图 2 长吻鲮各单倍型基于线粒体控制区序列构建的 NJ 树
Fig. 2 NJ tree based on the control region of 7 populations of *Leiocassis longirostris*

3 讨论

3.1 长吻鲮群体的遗传多样性

遗传多样性的研究是生物多样性研究的重要内容,只有通过遗传多样性的研究才能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化。核苷酸多态性(P_i)作为一个衡量群体间遗传多态性的重要指标,表示各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例。由实验结果可知,在长吻鲮养殖群体中 66 个个体线粒体控制区 790 bp 的序列中,总核苷酸突变位点为 27 个,共检测出 18 个单倍型。长吻鲮野生群体中 69 个个体共检测到 35 个变异位点,36 个单倍型。与长吻鲮野生群体相比,养殖群体的单倍型多样性和核苷酸多样性水平均较低($H_d=0.8867\pm 0.0013$, $P_i=0.0057\pm 0.0013$)。另外,从 3 个养殖群体内部的核苷酸位点突变情况来看,安徽淮南群体内有 22 个核苷酸位点的变异,湖北石首群体共产生 12 个变异位点,四川眉山群体有 17 个变异位点,分别只占总群体变异的 81.48%、44.44%和 62.96%。这表明遗传变异主要存在于群体内,群体间的基因变异较小。安徽淮南群体的基因多样性水平最高,石首和眉山河群体较低。Wang, *et al.*^[27]对取自长江上游和下游的野生长吻鲮进行 PCR-RFLP 分析,发现野生长吻鲮遗传多样性低,种群数量下降,这与已有野生种群的研究相一致^[28, 29]。而 Yang, *et al.*^[30]利用线粒体控制序列和核 SSR 标记研究长江上游、中游和下游野生长吻鲮遗传变异和种群结构,表明长江野生长吻鲮单倍型多样性较高,核苷酸多样性水平较低($H_d=0.9770\pm 0.0041$, $P_i=0.0081\pm 0.0043$)。上述研究结果表明,长吻鲮长期的人工养殖已使得该群体的遗传多样性水平明显降低,反映了长吻鲮作为我国鲶形目分布最广且产量较高的特产淡水名贵经济鱼类特殊的生命进化历程和适应复杂环境的能力。造成这一现象的主要原因可能是长吻鲮的基础群体数量较小、养殖过程的近交及遗传漂变等。而相对较高 H_d 值、低 P_i 值表明长吻鲮这个群体可能是由一个较小的有效群体迅速增长,尽管变异导致单倍型的多态性的积累,但核苷酸序列的多样化还未能积累^[31]。高的 H_d 为通过分子选育等技术有效防止品种退化提供了前提条件,并为保持遗传多样性水平,维持杂交选育优势提供了重要基础。这也在一定程度上说明定期补充不同地区不同群体的个体作为亲鱼进行繁育有利于保持长吻鲮人工繁殖群体的遗传多样性,避免

近亲繁殖和瓶颈效应。

3.2 长吻鮠群体的遗传结构分析

长吻鮠养殖群体的线粒体 D-loop 序列分析表明,平均(A+T)含量达 60.6%,明显高于(C+G)含量,该结果与其他鲶形目鱼类线粒体控制区(A+T)含量特别高的研究结果相符^[18]。群体间的遗传距离以及种群分化指数是衡量群体多态程度的重要指标,二者的值越大,群体多态性程度越高^[32]。根并正利利用遗传相似指数 IN 和遗传距离 D 值对物种的不同分类单位间的遗传变异水平作过定量估计,并指出种群间遗传距离 D 值的范围是 0—0.05;亚种间是 0.02—0.2^[33]。本实验结果表明,3 个养殖群体间的平均遗传距离为 0.005—0.006,淮南群体与石首群体间的平均遗传距离最小(0.005),其他群体间的遗传距离为 0.006。4 个野生群体间的平均遗传距离为 0.006—0.008,重庆群体与武汉群体间的平均遗传距离最大(0.008),这反映长吻鮠养殖群体与野生群体之间的遗传变异程度较小,群体间的分化程度不大。长吻鮠 7 个群体两两比较的遗传分化指数(F_{st})显示,安庆群体和石首群体之间的遗传分化最大($F_{st}=0.1125$),而武汉群体和安庆群体之间的遗传分化最小($F_{st}=0.0014$),其中长吻鮠养殖群体间的遗传分化高于野生群体间的遗传分化,长吻鮠养殖群体与野生群体间的遗传分化指数为 $F_{st}=0.0358$ 。根据 Wright^[34]关于遗传分化指数的大小和分化程度的解释, F_{st} 值在 0—0.05 表示低度遗传分化, F_{st} 值在 0.05—0.15 表示中度遗传分化,由此说明长吻鮠养殖群体与野生群体间的亲缘关系较近,长吻鮠养殖群体的遗传分化程度较低。Wright^[35]认为群体间基因流大于 1,则能发挥均质化作用,即能有效抑制由遗传漂变而引起的遗传分化反之,如果群体间基因流小于 1,则不能有效抑制由遗传漂变而引起的遗传分化,表明基因流成了遗传分化的主要原因。本研究表明,长吻鮠养殖群体与野生群体之间的 N_m 值达到 13.47,远远大于 1,可见其养殖群体与野生群体之间的基因交流比较充分,从而抑制了由遗传漂变导致的群体间遗传分化。目前养殖的长吻鮠来源于野生的种群,经过 20 多年的人工养殖和培育,已成为国内重要的淡水养殖鱼类。在人工繁育过程中,由于亲本数量的限制和遗传漂变,导致一些多态和稀有位点的丢失,隐性纯合位点数增加,使人工繁殖群体遗传多样性降低^[36]。造成这种原因一方

面可能是人工养殖长吻鮠时,为得到其高质量和高产量,人们经常筛选某一特定基因型的个体,从而使某些基因从该基因库中流失。此外,近亲交配也使得人工繁殖的长吻鮠遗传多样性下降。鱼类遗传多样性是改良鱼类品种和提高鱼类品质的物质基础,遗传多样性的降低或被破坏会给渔业生产带来损失^[37]。因此长期的人工养殖已经对长吻鮠的遗传结构产生了较大影响,有必要从野生种群引种,进一步丰富长吻鮠人工养殖群体的种质资源和遗传多样性。

参考文献:

- [1] He X F, Su L D, Zhou G R, *et al.* Study on domestication and reproduction test of *Leiocassis longirostris* [J]. *Freshwater Fisheries*, 1985, (1): 14—17 [何学福, 苏良栋, 周贵荣, 等. 长吻鮠的蓄养繁殖试验研究. 淡水渔业, 1985, (1): 14—17]
- [2] Fang J Q. Collection and domestication of *Leiocassis longirostris* from the Yangtze River [J]. *Scientific Fish Farming*, 1999, (7): 19 [方建清. 长江长吻鮠的收集与蓄养. 科学养鱼, 1999, (7): 19]
- [3] Liu J K, He B W. The Chinese Freshwater Fisheries Science (third edition) [M]. Beijing: Science and Technology Press. 1992, 304 [刘建康, 何碧梧. 中国淡水鱼类养殖学(第三版). 北京: 科学技术出版社. 1992, 304]
- [4] Gong J H. Test on cage culture wild *Leiocassis longirostris* in reservoir [J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(1): 54 [龚建辉. 水库网箱养殖野生长吻鮠试验. 水利渔业, 2006, 26(1): 54]
- [5] Wu Q J. Population ecology of *Leiocassis longirostris* (Günther) (Pisces, Bagridae) with reference to the problem of maximum sustained yield [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(3): 387—408 [吴清江. 长吻鮠种群生态学及其最大持续渔获量的研究. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 387—408]
- [6] Xiao M S, Wan Q. The biology and culture prospect of *Leiocassis longirostris* in the Yangtze River [J]. *Journal of Anhui Technical Teachers College*, 2001, 15(3): 49—51 [肖明松, 万全. 长江长吻鮠的生物学习性及其发展前景. 安徽技术师范学院学报, 2001, 15(3): 49—51]
- [7] Zhang Y Y. Researches and development of *Leiocassis longirostris* Günther [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 1998, S1(11): 134—139 [张义云. 长吻鮠 (*Leiocassis longirostris* Günther) 的研究与开发. 西南农业学报, 1998, S1(11): 134—139]
- [8] Mo Y X, Wang X Q, Mo Y L. Morphological and histological observations of digestive system in *Leiocassis longirostris* [J]. *Journal of Human Agricultural University* (Natu-

- ral Sciences), 2004, **30**(3): 267—271 [莫艳秀, 王晓清, 莫永亮. 长吻鲇消化系统的形态学与组织学观察. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, **30**(3): 267—271]
- [9] Luo M, Jiang L K, Liu Y, *et al.* Comparative study on isoenzymes in *Leiocassis longirostris* [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2000, **6**(5): 447—451 [罗曼, 蒋立科, 刘颖, 等. 野生与养殖长吻鲇血液及不同器官同工酶的比较. 应用与环境生物学报, 2000, **6**(5): 447—451]
- [10] Wan Q, Liu E S, Shen D L, *et al.* Analysis on karyotype of *Leiocassis longirostris* Gunther [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2002, **29**(2): 182—184 [万全, 刘恩生, 申德林, 等. 长吻鲇染色体组型分析. 安徽农业大学学报, 2002, **29**(2): 182—184]
- [11] Xiao M S, Yang G. Isolation and characterization of 17 microsatellite loci for the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, **9**(3): 1039—1041
- [12] Yu Y Y, Xiao M S, Chen L, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in the longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) [J]. *Aquaculture Research*, 2009, **40**(2): 246—248
- [13] Bermingham E, Avise J C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States [J]. *Genetics*, 1986, **113**(4): 939—965
- [14] 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**(10): 1885—1898
- [15] Mabuchi K, Senou H, Suzuki T, *et al.* Discovery of an ancient lineage of *Cyprinus carpio* from Lake Biwa, central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multiple origins of koi [J]. *Journal of Fish Biology*, 2005, **66**(6): 1516—1528
- [16] Kyle C J, Wilson C C. Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species [J]. *Forensic Science International*, 2007, **166**(1): 68—76
- [17] Teletchea F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2009, **19**: 265—293
- [18] Zhang Y, Zhang E, He S P. Studies on the structure of the control region of the bagridae in China and its phylogenetic significance [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(5): 463—467 [张燕, 张鸲, 何舜平. 中国鲿科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析. 水生生物学报, 2003, **27**(5): 463—467]
- [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, **24**: 4876—4882
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. Mega 3.0: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150—163
- [21] Rozas J, Sánchez-del Barrio J C, Messeguer X, *et al.* DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**: 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] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. *Molecular Ecology*, 2009, **9**: 1657—1660
- [24] Templeton A K, Crandall K A, Sing C F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation [J]. *Genetics*, 1992, **132**: 619—633
- [25] Posada D, Crandall K A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**: 13757—13762
- [26] Slatkin M, Hudson R R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations [J]. *Genetics*, 1991, **129**: 555—562
- [27] Wang Z W, Zhou J F, Ye Y, *et al.* Genetic structure and low-genetic diversity suggesting the necessity for conservation of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* Günther (Pisces: Bagridae) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2006, **75**: 455—463
- [28] Mo Y X, Wang X Q, Mo Y L. RAPD analysis of genetic diversity of *Leiocassis longirostris* [J]. *Journal of Jiangxi Fisheries Science*, 2010, **122**(2): 13—16 [莫艳秀, 王晓清, 莫永亮. 长吻鲇遗传多样性的 RAPD 分析. 江西水产科技, 2010, **122**(2): 13—16]
- [29] Wang H Y, Huang W Q. Preliminary analysis on the genetic diversity in four populations of *Leiocassis longirostris* by using microsatellite markers [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2011, **40**(2): 146—148 [王红莹, 黄文清. 应用微卫星标记分析长江流域长吻鲇 4 个群体的遗传多样性. 河南农业科学, 2011, **40**(2): 146—148]
- [30] Yang G, Xiao M S, Yu Y Y, *et al.* Genetic variation at mtDNA and microsatellite loci in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(4): 4605—4617
- [31] Avise J C. *Phylogeography: The History and Formation of Species* [M]. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press. 2000, 213—285
- [32] Meng W, Guo Y, Hai S, *et al.* Genetic structure and diversity of *Schizothorax biddulphi* populations [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 851—857 [孟玮, 郭焱, 海萨, 等. 塔里木裂腹鱼群体遗传结构及遗传多样性分析. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 851—857]
- [33] Masatoshi N. *Molecular Population Genetics and Evolution* [M]. Beijing: Agriculture Press. 1975, 121—133 [根井正

- 利. 分子群体遗传学与进化论. 北京: 农业出版社. 1975, 121—133]
- [34] Wright S. The genetical structure of population [J]. *Annals of Eugenics*, 1951, **15**: 323—334
- [35] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Genetics*, 1931, **16**: 97—159
- [36] Han X L, Xu J R, Li X R, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Elopichthys bambusa* by AFLP Markers [J]. *Journal of Nan jing Normal University* (Natural Science Edition), 2009, **32**(1): 110—114 [韩晓磊, 徐建荣, 李小蕊, 等. 鳊鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析. 南京师大学报(自然科学版), 2009, **32**(1): 110—114]
- [37] Yang X, Yang J F, Tang M L, *et al.* Intraspecific genetic polymorphisms of *Siniperca Scherzeri* Steindacher and molecular identification with *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(6): 891—895 [杨星, 杨军峰, 汤明亮, 等. 斑鳊种内遗传多态性以及与翘嘴鳊的分子鉴别. 水生生物学报, 2007, **31**(6): 891—895]

ANALYSIS ON SEQUENCE POLYMORPHISM OF THE MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION AND POPULATION GENETIC DIVERSITY OF THE CULTIVATED AND NATURAL CHINESE LONGSNOUT CATFISH (*LEIOCASSIS LONGIROSTRIS*)

XIAO Ming-Song, CUI Feng, KANG Jian and MA Yu-Han

(College of Life Science Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: The Chinese longsnout catfish is a semi-migratory fish which is commercially valuable in China. Due to overfishing, environmental pollution, and other human disturbances, the populations of this species have declined rapidly and disappeared in many river systems in the past decades. Currently, the Chinese longsnout catfish mainly inhabits the main streams of the Yangtze River and rarely found in lakes. At present, the Chinese longsnout catfish achieved appropriate scale farming in Sichuan, Guangdong and other places. However, seldom study was reported about analysis of population genetic structure using molecular markers. To protect and exploit this rare species effectively, investigations on population structures, resources and artificial reproduction have been conducted. In this study, the mitochondrial DNA control region were used to analyze genetic diversity and structure of 7 cultivated and natural populations of Chinese longsnout catfish collected from Meishan, Shishou, Huainan, Chongqing, Wuhan, Anqing and Nanjing named Meishan population, Shishou population, Huainan population, Chongqing population, Wuhan population, Anqing population and Nanjing population separately. The results showed the length of this region (D-loop) contained 790 bp nucleotides and the T, C, A and G contents were 31.5%, 25.3%, 29.1% and 14.1% respectively. Twenty-seven nucleotide sites and 18 haplotypes were found in 3 cultivated populations of Chinese longsnout catfish. Thirty-five nucleotide sites and 36 haplotypes were found in 4 natural populations of Chinese longsnout catfish. The average haplotype diversity and nucleotide diversity of cultivated populations of Chinese longsnout catfish were relatively low ($Hd = 0.8867 \pm 0.0013$, $Pi = 0.0056 \pm 0.0013$). The level of genetic differentiation was relatively low (0.0014—0.1125). Molecular phylogenetic tree and statistical parsimony network constructed by NJ method and statistical parsimony principles showed individuals from the same stock did not cluster together, and individuals from three different stocks nested with each other. These results suggested gene flow was sufficient between breeding populations and wild populations. They had no obviously genetic differentiation between breeding populations and wild populations. The genetic diversity of the cultivated populations of Chinese longsnout catfish was low.

Key words: *Leiocassis longirostris*; mtDNA; Control region; Sequencing