

基于 CO I 和 Cyt b 序列的丹江口水库鲢群体遗传结构分析

汪鄂洲¹, 李全宏², 徐念¹, 湛若云², 陈泽涛², 曹俊启²,
胡兴坤¹, 郭武山², 付昕², 董微微¹, 郑海涛^{1,3}, 赵鹏⁴, 阙廷福¹

(1. 水利部水工程生态效应与生态修复重点实验室, 水利部中国科学院水工程生态研究所, 湖北武汉 430079;

2. 南水北调中线水源有限责任公司, 湖北丹江口 442700;

3. 湖北中水长江生态保护研究院有限公司, 湖北武汉 430079;

4. 南水北调中线水源工程丹江口库区鱼类增殖放流站, 湖北丹江口 442700)

摘要:有效的人工增殖放流应监控放流群体和野生群体的遗传结构特征, 以避免放流群体对天然群体遗传多样性的负面影响。基于线粒体 CO I 和 Cyt b 基因, 分析了丹江口库区鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、丹江口鱼类增殖站鲢亲本和鲢子代 3 个群体的遗传结构特征。结果显示, 104 条 646 bp 线粒体 CO I 序列中共检测到多态位点 15 个, 简约信息位点 5 个, 单一变异位点 10 个, 定义了 7 个单倍型, 单倍型多样性为 0.544~0.676, 核苷酸多样性为 0.00221~0.00254; 103 条 1 058 bp 线粒体 Cyt b 序列中共检测到多态位点 19 个, 简约信息位点 13 个, 单一变异位点 6 个, 定义了 14 个单倍型, 单倍型多样性为 0.609~0.714, 核苷酸多样性为 0.00262~0.00424, 总体上处于较高单倍型多样性和较低核苷酸多样性。CO I 和 Cyt b 序列遗传距离、遗传分化指数以及基因流分析显示, 群体间遗传距离为 0.002 (CO I)、0.003~0.004 (Cyt b), 总遗传分化指数为 -0.00468 ($P>0.05$) (CO I)、0.03180 ($P>0.05$) (Cyt b), 差异均不显著; 群体间基因流为 14.69~41.47 (CO I)、5.49~40.47 (Cyt b), AMOVA 分子方差分析表明, 遗传变异主要来自群体内。单倍型聚类关系表明, 3 个鲢群体间均存在共享单倍型, 不同地理群体间单倍型散乱分布于各支, 未形成地理群体聚集。研究表明, 3 个鲢群体间不存在明显的遗传分化, 增殖放流鲢群体与丹江口库区野生群体的遗传多样性和遗传结构相近, 可开展增殖放流。研究结果可为丹江口鱼类增殖站鲢群体的增殖放流提供科学依据。

关键词: 鲢; 线粒体 DNA; 增殖放流; 遗传多样性; 遗传结构; 丹江口水库

中图分类号: Q343 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2022)04-0103-08

人工增殖放流是指直接向天然水域投放或移入生物的受精卵、幼体或成体, 以恢复或增加种群数量, 改善和优化水域的群落结构, 从而增加水域自然种群资源量, 改善水域生态环境(李继龙等, 2009)。丹江口水库作为南水北调中线工程重要水源地, 也是鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)野生群体的重要种质资源库(宋长河和谈华炜, 1993); 为补充丹江口库区鲢的野生资源量, 近年来已开展多次增殖放流活动(张君和张开刚, 2016)。然而, 科学的人工增殖放流必须建立在对放流物种遗传背景充分了解的基础上, 因人工繁殖群体中的亲本有限, 有限的基因库及近亲繁殖会导致子代遗传多样性降低; 与此同时,

若放流群体与野生群体遗传差异太大, 两者在自然水域进行基因交流, 可能造成野生群体种质资源下降与优良性状丧失。因此, 盲目放流可能会导致物种野生群体遗传多样性降低, 甚至造成遗传污染。为了避免人工放流群体对野生群体的负面影响, 应在放流之前评估野生群体的遗传特征(Blankenship & Leber, 2010); 另一方面, 从遗传多样性角度深入了解丹江口库区鲢的遗传资源现状, 对水生态环境保护以及鲢种质资源利用具有重要意义。

鲢属鲤形目、鲤科、鲢亚科、鲢属, 广泛分布于我国各大水系(李思发等, 1990; 乐佩琦, 2000); 其生长速度快、产量高、疾病少、繁殖能力强, 属中上层鱼类, 主要滤食浮游植物, 这种摄食方式能有效利用水体中浮游生物, 改善水体环境, 抑制藻类暴发, 有助于水质净化, 在生态渔业中发挥重要作用(Li et al, 2015)。近些年来, 由于拦河筑坝、水生态环境恶化以及过度捕捞等人为因素干扰, 导致鲢野生群体数量逐年减少。20 世纪 60 年代, 鲢在长江水系四大家鱼中占 26.1%, 而 80 年代只占 3.9%(张四明等, 2001)。长江上游部分江段鲢在渔获物中已不再是

收稿日期: 2021-02-07 修回日期: 2021-12-21

基金项目: 国家自然科学基金面上基金(31572593); 南水北调中线水源工程丹江口库区鱼类增殖放流站运行管理项目(ZSY/YG-YW [2018]002)。

作者简介: 汪鄂洲, 1991 年生, 男, 研究实习员, 主要从事水生生物保护研究。E-mail: 1358264422@qq.com

通信作者: 阙廷福。E-mail: yfque@mail.ihe.ac.cn

优势种,并且仔鱼数量呈下降趋势(刘绍平等,2004;2005)。鲢卵苗总量逐年下降,且在四大家鱼中的相对比例也显著下降(于悦,2016)。

近年来,已有一些学者利用不同类型的分子标记探究了长江水系鲢的遗传结构特征。李小芳(2012)利用微卫星和线粒体标记分析发现鲢群体遗传多样性较高,放流群体与野生群体间的遗传分化程度低;陈文静等(2013)利用线粒体控制区分析表明,赣江鲢群遗传多样性较低,增殖放流的鲢群体引起了鄱阳湖水系鲢群体遗传结构的分化;庞美霞等(2015)利用微卫星标记分析发现长江上游三峡库区5个鲢群体没有遗传分化,可视为一个群体;陈会娟等(2018)利用线粒体Cyt *b*和D-loop序列分析发现长江中上游鲢群体遗传多样性处于中等水平,上游与中游群体发生了显著的遗传分化,中游群体间没有发生遗传分化;沙航等(2018)利用线粒体CO I序列分析表明,鲢群体总体遗传多样性丰富,上游与中游群体间遗传分化显著。现有研究较为详细地掌握了长江干、支流及鄱阳湖等水域鲢群体的遗传背景资料,但对丹江口库区鲢群体的研究报道较少,尤其是有关库区野生鲢群体与放流群体间的遗传差异研究十分匮乏。本研究基于线粒体CO I和Cyt *b*序列,分析丹江口库区鲢野生群体、丹江口鱼类增殖放流站亲本以及放流苗种群体的遗传结构特征,了解库区鲢野生群体遗传资源现状,评估放流群体对野生群体资源的影响,一方面可为科学、规范的增殖放流活动提供技术支撑;另一方面可为南水北调中线水源地丹江口库区的渔业资源合理开发和水生态环境保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究的3个鲢群体样本分别采集于丹江口库区和丹江口鱼类增殖站,累计采集样本104尾,详情见表1。每尾鱼经形态鉴定后,剪取每尾鲢适量尾鳍置于装有无水乙醇的5 mL EP管中,带回实验室冻存于-20℃冰箱保存备用。

1.2 基因组总DNA提取及PCR扩增

取适量的鲢鳍条组织,采用酚/氯仿法提取基因组总DNA(萨姆布鲁克和拉塞尔,2002),溶解于200 μ L TE缓冲液中,保存于-20℃冰箱备用。通过引物FishF1-Fish R2扩增CO I序列(Ward et al, 2005);采用通用引物L14724和H15915扩增鲢的Cyt *b*基因(Xiao et al, 2001)。PCR反应体系为40 μ L,其中Mix 20 μ L、引物2 μ L、双蒸水14 μ L、DNA模板2 μ L。

PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性40 s,58℃退火45 s,72℃延伸2 min,35个循环后72℃延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带清晰且单一的PCR产物送至天一辉远生物科技有限公司测序。测序引物为PCR扩增引物(表2)。

表1 鲢样本信息

Tab.1 Information on the *H. molitrix* specimens

采样区域	群体名称	样品数/尾	样本来源	采集时间
丹江口库区	Lian-KQ (鲢-库区群体)	49	丹江口库区	2019-08 2020-08
丹江口鱼类增殖站	Lian-QB (鲢-亲本群体)	15	汉江襄阳江段	2019-10
丹江口鱼类增殖站	Lian-ZD (鲢-子代群体)	40	增殖站繁育 (部分外购)苗种	2019-10

表2 鲢CO I和Cyt *b*序列扩增引物信息

Tab.2 Amplification primers for CO I and Cyt *b* gene sequences of *H. molitrix*

引物名称	序列(5'-3')	退火温度/℃	产物大小/bp
CO I-F	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	58	750
CO I-R	TAGCTTCTGGGCCAAAGATCA		
L14724	GACTTGAAAAACCACCGTTG	58	1300
H15915	CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC		

1.3 数据处理

利用软件 FinchTV 对测序得到的CO I和Cyt *b*序列进行拼接,辅以人工校对;利用MEGA 7.0软件中的ClustalW程序进行序列比对,确定序列的边界和长度,并与NCBI数据库中已发表的鲢mtDNA序列进行对比,确保获得鲢群体的CO I和Cyt *b*序列准确性。利用DnaSP 5.0软件计算单倍型数目(N)、变异位点(V)、单倍型多样性(H_d)、核苷酸多样性(P_i)、平均核苷酸差异数(K)、基因流(N_m)以及单倍型类型等参数。对于不同单倍型之间的变异位点(尤其是单碱基变异位点),根据原始测序峰图进行逐一核对,排除在PCR或测序过程中可能导致的突变位点。用MEGA 7.0软件对序列进行进一步分析,统计序列的碱基组成等相关参数,利用Kimura双参数模型计算群体间的遗传距离,利用NJ法构建基于线粒体单倍型序列的聚类关系树。利用Arlequin 3.01(Excoffier & Lischer, 2010)软件中的分子方差分析(AMOVA)计算群体遗传变异来源、变异方差和固定指数(F_{st}),计算时设置1000次重复,随机抽样重排后进行显著性检验,用于评估3个鲢群体遗传结构以及不同地理分布区域鲢群体的遗传分化情况。

2 结果

2.1 碱基组成

经测序比对,共获得3个鲢群体104条有效线粒体CO I和103条有效的Cyt b序列,长度分别为646 bp和1 058 bp。基于CO I基因序列分析结果表明,碱基平均含量分别为T=29.8%,C=26.7%,A=26.1%,G=17.4%;其中A+T的平均含量为55.9%,G+C为44.1%。从104条长646 bp的鲢线粒体CO I序列中共检测到多态位点15个,其中简约信息位点5个,单一变异位点10个,定义了7个单倍型;其中4个单倍型为3个群体共有单倍型,1个单倍型为2个群体共

有,2个单倍型仅在单群体中检测到(表3)。基于Cyt b基因序列分析结果表明,碱基的平均含量分别为T=29.2%,C=28.3%,A=28.9%,G=13.6%;其中A+T的平均含量为58.1%,G+C为41.9%。从103条长1 058 bp的鲢线粒体Cyt b序列中共检测到多态位点19个,其中简约信息位点13个,单一变异位点6个,定义了14个单倍型;其中2个单倍型为3个群体共有单倍型,1个单倍型为2个群体共有,11个单倍型(78.6%)仅在单群体中检测到(表3)。3个鲢群体线粒体CO I和Cyt b序列中均以T所占比例最高,G所占比例最低,具有明显的碱基偏倚性特征(Kocher et al, 1989)。

表3 鲢3个群体单倍型数目、类型、频率及分布

Tab.3 Haplotype number, type, frequency, and distribution in the three *H. molitrix* populations

单倍型	CO I样品数(占比/%)				单倍型	Cyt b样品数(占比/%)			
	Lian-KQ	Lian-QB	Lian-ZD	总计		Lian-KQ	Lian-QB	Lian-ZD	总计
Hap1	32 (65.3)	8 (53.3)	20 (50.0)	60 (57.7)	Hap1	29 (60.4)	8 (53.3)	19 (47.5)	56 (54.4)
Hap2	9 (18.4)	4 (26.7)	6 (15.0)	19 (18.3)	Hap2	0	0	6 (15.0)	6 (5.8)
Hap3	3 (6.1)	1 (6.7)	10 (25.0)	14 (13.5)	Hap3	3 (6.3)	1 (6.7)	10 (25.0)	14 (13.6)
Hap4	2 (4.1)	1 (6.7)	4 (10.0)	7 (6.7)	Hap4	0	0	4 (10.0)	4 (3.9)
Hap5	1 (2.0)	1 (6.7)	0	2 (1.9)	Hap5	0	0	1 (2.5)	1 (1.0)
Hap6	1 (2.0)	0	0	1 (1.0)	Hap6	8 (16.7)	2 (13.3)	0	10 (9.7)
Hap7	1 (2.0)	0	0	1 (1.0)	Hap7	0	2 (13.3)	0	2 (1.9)
					Hap8	0	1 (6.7)	0	1 (1.0)
					Hap9	0	1 (6.7)	0	1 (1.0)
					Hap10	2 (4.2)	0	0	2 (1.9)
					Hap11	3 (6.3)	0	0	3 (2.9)
					Hap12	1 (2.1)	0	0	1 (1.0)
					Hap13	1 (2.1)	0	0	1 (1.0)
					Hap14	1 (2.1)	0	0	1 (1.0)

2.2 群体遗传多样性

基于3个鲢群体104条线粒体CO I序列分析结果显示,3个鲢群体共定义了7个单倍型,3个群体单倍型多样性(H_d)均较高,在(0.544±0.075)~(0.676±0.105),核苷酸多样性(P_i)较低,在(0.00221±0.00021)~(0.00254±0.00045),总体上处于高单倍型多样性和低核苷酸多样性, H_d =(0.617±0.044), P_i =(0.00238±0.00031)。就各群体的单倍型多样性而言,Lian-QB最高,Lian-ZD次之,Lian-KQ最低;就各群体的核苷酸多样性而言,Lian-QB最高,Lian-KQ次之,Lian-ZD最低;3个群体平均核苷酸差异相近,Lian-QB最大,其次为Lian-KQ,Lian-ZD差异最小。基于3个鲢群体103条线粒体Cyt b序列分析显示,3个鲢群体共

定义了14个单倍型,3个群体单倍型多样性均较高, H_d 在(0.609±0.073)~(0.714±0.116),核苷酸多样性较低, P_i 在(0.00262±0.00046)~(0.00424±0.00037),总体上处于高单倍型多样性和低核苷酸多样性, H_d =(0.676±0.047), P_i =(0.00336±0.00031)。就各群体的单倍型多样性而言,Lian-QB最高,Lian-ZD次之,Lian-KQ最低;此外,Lian-ZD中有3个特有单倍型,是因为在丹江口鱼类增殖站初步运行阶段,站内繁育苗种数量有限,因此引进了部分苗种来满足增殖放流需求。就各群体的核苷酸多样性而言,Lian-ZD最高,Lian-QB次之,Lian-KQ最低;3个群体平均核苷酸差异较大,Lian-ZD最大,其次为Lian-QB,Lian-KQ最小(表4)。

表 4 鲢群体遗传多样性参数

Tab.4 Genetic diversity indices of the *H. molitrix* populations

基因	群体	序列数	变异位点	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异
CO I	Lian-KQ	49	15	7	0.544±0.075	0.00249±0.00061	1.61054
	Lian-QB	15	5	5	0.676±0.105	0.00254±0.00045	1.63810
	Lian-ZD	40	4	4	0.672±0.053	0.00221±0.00021	1.43077
	总计	104	15	7	0.617±0.044	0.00238±0.00031	1.54052
Cyt <i>b</i>	Lian-KQ	48	15	8	0.609±0.073	0.00262±0.00046	2.76152
	Lian-QB	15	11	6	0.714±0.116	0.00289±0.00071	3.04762
	Lian-ZD	40	11	5	0.696±0.051	0.00424±0.00037	4.47308
	总计	103	19	14	0.676±0.047	0.00336±0.00031	3.55226

2.3 群体遗传差异

基于 Kimura 双参数 (K2-P) 模型计算 3 个鲢群体间和群体内的遗传距离, CO I 分析结果显示 (表 5), 3 个鲢群体间和群体内的遗传距离均较小 (0.002~0.003), 其中群体间的遗传距离均为 0.002, 而群体内的遗传距离 Lian-ZD 最小。Cyt *b* 分析结果显示, 3 个鲢群体间和群体内的遗传距离均较小 (0.003~0.004), 其中 Lian-KQ 和 Lian-QB 群体间遗传距离最小, Lian-ZD 群体内的遗传距离最大。

表 5 鲢群体内和群体间的遗传距离

Tab.5 Genetic distance within each *H. molitrix* population and between the three *H. molitrix* populations

基因	群体	Lian-KQ	Lian-QB	Lian-ZD
CO I	Lian-KQ	0.003		
	Lian-QB	0.002	0.003	
	Lian-ZD	0.002	0.002	0.002
Cyt <i>b</i>	Lian-KQ	0.003		
	Lian-QB	0.003	0.003	
	Lian-ZD	0.004	0.004	0.004

基于 CO I 序列分析群体间遗传分化指数 F_{st} 和基因流 N_m 结果显示 (表 6), 3 个鲢群体间的 F_{st} 在 -0.02803~0.01079, 显著性检验 P 均大于 0.05, 表明 3 个群体间基本上没有遗传分化, 3 个群体基因流 N_m 在 14.69~41.47, 表明群体间存在频繁的基因交流; Cyt *b* 分析结果显示, F_{st} 在 -0.02905~0.05646, Lian-KQ 和 Lian-ZD 群体间 $F_{st}=0.05646$, 且 $P<0.05$, 表明 2 个群体间存在较低的遗传分化, 基因流 N_m 在 5.49~40.47, 表明群体间存在一定程度的基因交流。

分子方差分析 (AMOVA) 结果显示 (表 7), 无论是 CO I 基因还是 Cyt *b* 基因均表明, 3 个鲢群体

的遗传变异主要来自群体内, 群体间的遗传变异仅占 -0.47% (CO I)、3.18% (Cyt *b*)。

表 6 鲢群体间的遗传分化系数和基因流

Tab.6 The F_{st} and N_m value among *H. molitrix* populations

基因	群体	Lian-KQ	Lian-QB	Lian-ZD
CO I	Lian-KQ		41.47	14.69
	Lian-QB	-0.02803		32.16
	Lian-ZD	0.01079	-0.02769	
Cyt <i>b</i>	Lian-KQ		40.47	5.49
	Lian-QB	-0.02905		9.87
	Lian-ZD	0.05646*	0.00947	

注: 对角线之下为 F_{st} 值, 对角线之上为 N_m 值。*表示 $P<0.05$ 。

Note: below the diagonal is the F_{st} value, and above the diagonal is the N_m value. * indicates $P<0.05$.

2.4 系统进化关系

基于 Kimura (K2-P) 双参数模型构建的鲢群体 CO I 和 Cyt *b* 单倍型序列系统发生 NJ 树, 各分支的置信度 (bootstrap) 均进行 1 000 次重复检验 (Felsenstein, 1985)。从 CO I 单倍型序列 NJ 树可以看出, CO I-lian-Hap-6 和 CO I-lian-Hap-7 是 Lian-KQ 群体特有单倍型, 3 个鲢群体存在 2 个明显的单倍型谱系分支, 来自 Lian-KQ 群体的 CO I-lian-Hap-7 单独聚为一支, 其余 6 个单倍型聚为另一支 (图 1-A)。Cyt *b* 单倍型序列 NJ 树结果显示, 3 个鲢群体同样存在 2 个明显的单倍型谱系分支, 单倍型 Cyt *b*-lian-Hap-2、Cyt *b*-lian-Hap-3、Cyt *b*-lian-Hap-6、Cyt *b*-lian-Hap-7 和 Cyt *b*-lian-Hap-13 单倍型聚为一个分支, 其余单倍型聚为另外一个大的分支, 单倍型聚类关系中各群体单倍型散乱分布, 3 个鲢群体间并未形成明显的地理谱系 (图 1-B)。

表7 鲢群体变异的方差分析

Tab.7 AMOVA analysis among *H. molitrix* populations

基因	变异来源	自由度	平方和	变异组成	变异比例/%
CO I	群体间	2	1.317	-0.00360 ^{V_a}	-0.47
	群体内	101	78.020	0.77247 ^{V_b}	100.47
	总变异	103	79.337	0.76887	
	总遗传分化指数(F_{st})			-0.00468($P>0.05$)	
Cyt <i>b</i>	群体间	2	8.077	0.06523 ^{V_a}	3.18
	群体内	100	198.642	1.98642 ^{V_b}	96.82
	总变异	102	206.718	2.05165	
	总遗传分化指数(F_{st})			0.03180($P>0.05$)	

注: V_a 和 V_b 分别表示群体间变异和群体内变异。

Note: V_a , V_b respectively mean variations among populations and within a single population.

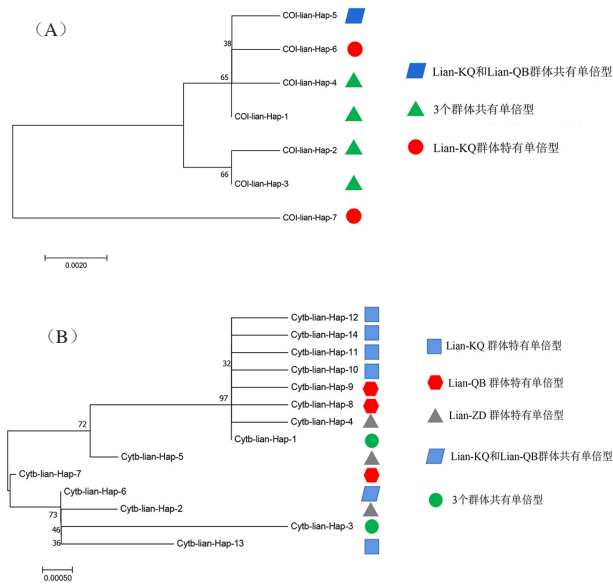


图1 基于CO I(A)和Cyt *b*(B)序列单倍型系统发育树

Fig.1 NJ tree of the three populations based on haplotypes of CO I (A) and Cyt *b* (B) sequences

3 讨论

3.1 丹江口库区鲢群体具有较高的单倍型多样性

遗传多样性即基因多样性,存在于单个物种内和物种间,是生物适应和进化的基础,也是物种进化潜能的保证(倪守胜等,2017)。遗传多样性的高低决定了种群生存、繁衍和扩增潜力的大小,也反映物种或种群对外界环境因素变化适应能力的强弱(Frankham et al, 2002; Spielman et al, 2004)。种群数量大幅度的变化和生存环境的不连续性,都会导致群体间出现遗传分化(孙鹏等,2011)。单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(P_i)是衡量种群遗传变异的2个重要指标(Nei, 1987)。从整体上看,鲢3个群体的线粒体CO I和Cyt *b*单倍型多样性分别为0.617

和0.676,核苷酸多样性分别为0.00238和0.00336,相较于长江水系其他鲢群体线粒体DNA遗传多样性,如陈会娟等(2018)利用Cyt *b*基因和D-loop序列分析了长江中上游4个鲢群体遗传多样性,其平均 H_d 和 P_i 分别为0.693、0.00748(Cyt *b*)和0.902、0.01557(D-loop);沙航等(2018)基于CO I序列分析了长江中上游鲢6个地理群体的遗传多样性,其平均 H_d 和 P_i 为0.785、0.00542;于悦(2016)利用线粒体D-loop序列分析了长江、赣江、鄱阳湖3个鲢群体遗传多样性,得出其平均 H_d 和 P_i 为0.9137和0.01609。本研究中3个鲢群体的线粒体DNA所展示的单倍型多样性相对偏低。

首先,Lian-ZD群体为人工繁殖群体,亲本来源及遗传多样性水平可能会影响子代群体的遗传多样性;其次,CO I和Cyt *b*基因相对于D-Loop更保守,因而其遗传多样性相对较低。与其他常见经济鱼类线粒体DNA遗传多样性相比,鲢单倍型多样性高于草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) $H_d=0.5855$ (Cyt *b*)(翟东东等,2020)、岩原鲤(*Procypris rabaudi*) $H_d=0.590$ (Cyt *b*)(张晓宇等,2020),而低于清水江鲤(*Cyprinus carpio*) $H_d=0.964$ (CO I)(向燕等,2013)、银鲌(*Xenocypris argentea*) $H_d=0.775$ (CO I)(刘军等,2015);核苷酸多样性高于草鱼 $P_i=0.001$ (Cyt *b*)、岩原鲤 $P_i=0.00132$ (Cyt *b*)、银鲌 $P_i=0.00219$ (CO I),而低于清水江鲤 $P_i=0.00451$ (CO I)。总体上看,鲢3个群体具较高单倍型多样性和较低核苷酸多样性。参考相关分类标准(Grant & Bowen, 1998), $H_d>0.5$ 、 $P_i>0.005$ 为高单倍型多样性、高核苷酸多样性类型, $H_d>0.5$ 、 $P_i<0.005$ 为高单倍型多样性、低核苷酸多样性类型。本研究中,鲢3个群体CO I和Cyt *b*基因分析结果均符合高单倍型多样性、低核苷酸多样性类型。此类型种群通常由一个较小的有效种群经过近

期快速扩张形成一个大的种群,在扩张过程中,其种群数量的增加,提高了单倍型的多样性,但核苷酸的变异速率较慢,尚没有充足的时间去积累核苷酸变异,从而表现出单倍型多样性高而核苷酸多样性低的遗传多样性模式(Grant & Bowen, 1998);因此推测鲢 3 个群体历史上可能经历了种群扩张。

3.2 丹江口库区不同鲢群体间的遗传分化不显著

遗传距离的大小反应了群体间亲缘关系的远近。一般来说,物种内的遗传距离小于 0.1、群体间遗传距离大于 0.6,则表明有明显的亚种或者种群的分化(Billington & Hebert, 1991; Yang et al, 2002)。基于 CO I 和 Cyt *b* 分析结果可知,鲢 3 个群体间遗传距离远小于 0.6,表明其群体间无显著遗传分化。遗传分化和遗传交流程度常用群体分化指数(F_{st})和基因流(N_m)来表示,根据其 F_{st} 值大小可判断群体间遗传分化程度的情况。本研究中,CO I 和 Cyt *b* 整体分析结果显示,鲢 3 个群体的 F_{st} 分别为 -0.00468 ($P > 0.05$)、0.03180 ($P > 0.05$)。根据 Freeland 等(2012)提出的分类标准: $F_{st} > 0.05$,遗传分化不显著; $0.05 < F_{st} < 0.15$,遗传分化偏低; $F_{st} > 0.25$,遗传分化极大。由此可知,整体上 3 个鲢群体间遗传分化程度不显著,无论是从 CO I 还是 Cyt *b* 序列来看,群体间基因流(N_m)均大于 5.00,表明群体间基因交流频繁,遗传分化不显著,这与他人的研究结果相似(庞美霞等, 2015; 于悦, 2016; 沙航等, 2018)。基于 CO I 和 Cyt *b* 序列分子方差分析显示,群体内变异是总变异的主要来源,也证实了 3 个鲢群体间遗传分化程度很低。从群体间聚类分析可知,3 个鲢群体间均有共享单倍型,且不同群体间单倍型散乱分布于各支,没有形成地理群体的聚集,同样也表明鲢群体间遗传分化不显著。据溯祖理论(Ma et al, 2010),CO I 中单倍型 CO I-lian-Hap-1、CO I-lian-Hap-2、CO I-lian-Hap-3、CO I-lian-Hap-4 是 3 个群体共有单倍型且数量较多,可能为祖先类型;而 Cyt *b* 中 Cyt *b*-lian-Hap-1、Cyt *b*-lian-Hap-3 可能为祖先类型。

3.3 科学增殖放流可保障鲢群体的遗传多样性

已有研究表明,盲目的增殖放流会对自然种群产生显著的负面遗传影响(Araki & Schmid, 2010),这种影响主要来源于放流群体与自然种群的较大遗传差异(冯晓婷等, 2020)。为避免放流群体遗传多样性显著低于野生群体,导致放流物种整体遗传多样性降低,在放流前评估放流群体与自然种群的遗传差异是科学有效放流的前提;同时,还应开展增殖站繁育群体的遗传管理,建设遗传信息档案库,掌握亲本、子代和库区种群的遗传背景,对亲本、子代和

库区群体的遗传多样性和遗传结构实施持续的监测,将增殖放流风险降至最低。

2017 年,农业部在《关于进一步规范水生生物增殖放流工作的通知》中明确指出,增殖放流物种应遵循“哪里来、哪里放”的原则,避免跨流域水系放流可能形成的潜在生态风险。本研究中,Lian-QB 群体、Lian-ZD 群体和 Lian-KQ 群体遗传多样性接近,3 个鲢群体间遗传分化不显著,表明放流群体基因库来源丰富,遗传多样性水平与野生群体接近;单倍型分布结果显示了库区群体与增殖站群体的单倍型分布在 CO I 和 Cyt *b* 上存在差异,Lian-KQ 群体具有特有单倍型,说明库区群体与增殖站群体间存在不同的单倍型类群,为提高繁殖亲本的遗传多样性水平,应适当增加库区的自然群体作为繁殖亲本,丰富放流子代的遗传资源来源,为丹江口库区鲢群体的遗传多样性维持提供保障。因此,在丹江口鱼类增殖站的研究中,应持续监测繁殖群体遗传质量,深入探究增殖放流对野生群体的遗传影响和长期放流对野生群体遗传渐渗和世代累加效应,以期构建丹江口库区科学有效的增殖放流策略提供理论支持和数据参考。

综上,本研究中 3 个鲢群体间遗传距离很小,基因交流频繁,遗传分化不显著,可视为同一保护单元放流至丹江口库区水域,但 Cyt *b* 研究结果显示,Lian-KQ 群体和 Lian-ZD 群体发生了初步分化,应在放流后开展放流群体与自然群体遗传分化情况的持续跟踪研究;此外,随着渔业资源的进一步开发以及丹江口库区水生态环境的变化,增殖站群体间是否发生近交现象仍有待进一步探究,且不同地理群体的增殖放流是否会产生遗传污染,值得后期持续关注。

参考文献

- 陈会娟,刘明典,汪登强,等,2018. 长江中上游 4 个鲢群体遗传多样性分析[J]. 淡水渔业,48(1):21-25.
- 陈文静,张燕萍,段辛斌,等,2013. 基于线粒体控制区全序列的鄱阳湖水系鲢增殖放流群体与野生群体的遗传多样性分析[J]. 中国农学通报,29(35):89-95.
- 冯晓婷,张桂宁,薛向平,等,2020. 基于 SSR 标记的长江下游原良种场鲢亲本和后亲本种质资源现状分析[J]. 中国水产科学,27(5):589-597.
- 乐佩琦,2000. 中国动物志:硬骨鱼纲:鲤形目(下卷)[M]. 北京:科学出版社.
- 李继龙,王国伟,杨文波,等,2009. 国外渔业资源增殖放流状况及其对我国的启示[J]. 中国渔业经济,27(3):115-127.
- 李思发,吴力钊,王强,等,1990. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M]. 上海:上海科学出版社.

- 李小芳,2012. 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)亲本增殖放流遗传效果评估[D]. 重庆:西南大学.
- 刘军,赵良杰,刘其根,等,2015. 不同水系银鲫自然群体线粒体CO I基因遗传变异研究[J]. 淡水渔业,45(6):3-8.
- 刘绍平,陈大庆,段辛斌,等,2004. 长江中上游四大家鱼资源监测与渔业管理[J]. 长江流域资源与环境,13(2):183-186.
- 刘绍平,段辛斌,陈大庆,等,2005. 长江中上游渔业资源现状研究[J]. 水生生物学报,29(6):708-711.
- 倪守胜,杨钰,柳淑芳,2017. 基于线粒体Cyt b基因的虾夷扇贝群体遗传结构分析[J]. 中国水产科学,24(3):432-439.
- 庞美霞,俞小牧,童金苟,2015. 三峡库区5个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水生生物学报,39(5):869-876.
- 沙航,罗相忠,李忠,等,2018. 基于CO I序列的长江中上游鲢6个地理群体遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,25(4):81-90.
- 宋长河,谈华炜,1993. 浅谈丹江口水库渔业利用现状及发展意见[J]. 水利渔业,(6):28-30.
- 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W,2002. 分子克隆实验室指南[M]. 3版. 黄培堂译. 北京:科学出版社.
- 孙鹏,彭士明,尹飞,等,2011. 南海海区鳙鱼(*Mugil cephalus*)CO I基因序列的遗传多样性分析[J]. 海洋与湖沼,42(1):131-136.
- 向燕,朱玲,胡世然,等,2013. 清水江鲤鱼线粒体CO I基因序列变异及遗传多样性[J]. 贵州农业科学,41(6):17-20.
- 于悦,2016. 长江、赣江、鄱阳湖鲢遗传多样性和群体遗传结构分析[D]. 武汉:华中农业大学.
- 翟东东,蔡金,喻记新,等,2020. 长江上游5个草鱼群体的遗传多样性[J]. 淡水渔业,50(5):81-87.
- 张君,张开刚,2016. 湖北丹江口水库首次开展冬季水生生物增殖放流活动[J]. 渔业致富指南,(2):12.
- 张四明,邓怀,汪登强,等,2001. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的RAPD研究[J]. 水生生物学报,25(4):324-330.
- 张晓宇,张富铁,姚富城,等,2020. 岩原鲤遗传多样性和种群历史动态研究[J]. 水生生物学报,44(2):330-338.
- Araki H, Schmid C, 2010. Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys[J]. Aquaculture, 308(S1): 2-11.
- Billington N, Hebert P B N, 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can J Fish Aquat Sci, 48 (S1): 88-94.
- Blankenship H L, Leber K M, 2010. A responsible approach to marine stock enhancement: An Update[J]. Reviews in Fisheries Science, 18(2): 189-210.
- Excoffier L, Lischer H E, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources, 10(3): 564-567.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 39(4): 783-791.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe D, 2002. Introduction to Conservation genetics[M]. Cambridge: Cambridge University Press.
- Freeland J R, Kirk H, Petersen S, 2012. Molecular Ecology, Second Edition[M]. Trent University: A John Wiley & Sons, Ltd, Publication.
- Grant W, Bowen B, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. Journal of Heredity, 89(5): 415-426.
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16): 6196-6200.
- Li Z, Liang H W, Luo X Z, Pan, et al, 2015. A consecutive self-proliferate silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) variety created through artificial meiotic gynogenesis[J]. Aquaculture, 437:21-29.
- Ma C, Cheng Q, Zhang Q, et al, 2010. Genetic variation of *Coilia ectenes* (Clupeiformes: Engraulidae) revealed by the complete cytochrome b sequences of mitochondrial DNA[J]. Journal of Experimental Marine Biology Ecology, 385(1/2): 14-19.
- Nei M, 1987. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press:10-88.
- Spielman D, Brook B, Frankham R, 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factor impact them[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(42): 15261-15264.
- Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al, 2005. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Phil Trans R Soc B, 360: 1847-1857.
- Xiao W H, Zhang Y P, Liu H Z, 2001. Molecular systematics of xenocyprininae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy biogeography and coevolution of a special group restricted in East Asia[J]. Mol Phylogenet Evol, 18(2):163-173.
- Yang X G, Wang Y Q, Zhou K Y, et al, 2002. Authentication of oviductus ranae and its original animals using molecular marker [J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 25(8): 1035-1039.

Genetic Structure Analysis of *Hypophthalmichthys molitrix* Populations in Danjiangkou Reservoir Based on Mitochondrial CO I and Cyt *b* Sequences

WANG E-zhou¹, LI Quan-hong², XU nian¹, ZHAN Ruo-yun², CHEN Ze-tao², CAO Jun-qi², HU Xing-Kun¹, GUO Wu-shan², FU Xin², DONG Wei-wei¹, ZHENG Hai-tao^{1,3}, ZHAO Peng⁴, QUE Yan-fu¹

(1. Key Laboratory of Ecological Impacts of Hydraulic-projects and Restoration of Aquatic Ecosystem of Ministry of Water Resources, Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430079, P.R. China;

2. The Middle Route of South-to-North Water Diversion Project Headwater Source Co. Ltd, Danjiangkou 442700, P.R. China;

3. Institute of Changjiang Ecological Conservation Co. LTD, Wuhan 430014, P.R. China;

4. Danjiangkou Fish Breeding and Releasing Station of the Middle Route of South-to-North Water Diversion Project Headwater Source Co. Ltd, Danjiangkou 442700, P.R. China)

Abstract: Danjiangkou reservoir is an important source area for the middle route of the South-to-North Water Diversion Project and an important germplasm bank for wild *Hypophthalmichthys molitrix*. In recent years, captive breeding and release of *H. molitrix* in Danjiangkou reservoir has been carried out many times to supplement wild populations. Effective artificial breeding and release should monitor the genetic characteristics of both released and wild populations so that the released fish do not reduce the genetic diversity of natural populations. In this study, we analyzed the genetic structure of three *H. molitrix* populations (Lian-QB, Lian-ZD, Lian-KQ) in Danjiangkou reservoir, based on mitochondrial CO I and Cyt *b* gene amplification of the three populations. We aimed to understand the genetic status of wild *H. molitrix* populations and evaluate the effect of released fish on wild populations in the reservoir area. The results also provide scientific evidence for the rational exploitation of fishery resources and conservation of the aquatic ecological environment in the Danjiangkou reservoir area. A total of 104 specimens from the three *H. molitrix* populations were selected for the study. A total of 104 CO I sequences and 103 Cyt *b* sequences were obtained through gene amplification, with lengths of 646 bp and 1 058 bp, respectively. All CO I sequences contained 15 polymorphic sites, 5 parsimony information sites and 10 single variant sites that defined 7 haplotypes. The haplotype diversity was 0.544–0.676 and the nucleotide diversity was 0.00221–0.00254. A total of 19 polymorphic sites, 13 parsimony information sites and 6 single variant sites were identified in the 103 Cyt *b* sequences, defining 14 haplotypes. The haplotype diversity was 0.609–0.714 and the nucleotide diversity was 0.00262–0.00424. The CO I and Cyt *b* genes both presented a high haplotype diversity level and a low nucleotide diversity level. Genetic distance between the three populations was 0.002 for CO I gene and 0.003–0.004 for Cyt *b* gene, and the total genetic differentiation index (F_{st}) was –0.00468 for CO I gene ($P > 0.05$) (CO I) and 0.03180 for Cyt *b* gene ($P > 0.05$), indicating that there was no significant genetic differentiation among the three *H. molitrix* populations. Genetic flow between the populations was 14.69–41.47 (CO I) and 5.49–40.47 (Cyt *b*), respectively. AMOVA analysis shows that the genetic variation of the populations primarily occurred within the population. Cluster analysis of the three populations was carried out based on the haplotype and results show that there were shared haplotypes among the three *H. molitrix* populations, and the haplotypes were scattered among the branches of different geographic populations, and no geographic clusters were formed. In a word, there was no obvious genetic differentiation among the three *H. molitrix* populations, indicating that the released silver carps had no adverse impact on the genetic diversity and genetic structure of the wild population in the Danjiangkou reservoir area.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; mitochondrial DNA; artificial breeding and restocking; genetic diversity; genetic structure; Danjiangkou reservoir