

doi: 10.7541/2015.46

## 我国草鱼野生群体 D-Loop 序列遗传变异分析

傅建军<sup>1,2</sup> 王荣泉<sup>3</sup> 沈玉帮<sup>1</sup> 宣云峰<sup>3</sup> 徐晓雁<sup>1</sup> 刘承初<sup>2</sup> 李家乐<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学食品科学与工程博士后流动站, 上海 201306; 3. 苏州市吴江水产养殖有限公司, 农业部大宗淡水鱼类繁育与健康养殖技术重点实验室, 苏州 215221)

**摘要:** 利用线粒体 DNA 的 D-Loop 区序列, 对来自长江水系(邗江、吴江、九江、石首、木洞和万州)、珠江水系(肇庆)和黑龙江水系(嫩江)的 8 个草鱼野生群体开展了遗传变异分析。在 424 尾鱼中检测到 34 个变异位点, 34 个单倍型, 单倍型多样性介于 0.474—0.708。群体间 Kimura 双参数遗传距离介于 0.0020—0.0049。长江下游 3 个群体间遗传距离最近, 遗传分化不显著( $P>0.05$ ); 肇庆群体与长江上游 3 个群体遗传距离较近, 与九江群体遗传分化不显著( $P>0.05$ ); 嫩江群体与长江上游 2 个群体遗传距离较近, 与万州群体遗传分化不显著( $P>0.05$ )。遗传距离与地理距离存在极显著正相关( $R=0.61, P<0.01$ )。分子方差分析显示, 不同流域间遗传变异占总变异 26.24%, 差异极显著( $P<0.01$ )。34 个单倍型分为 2 个分支, 分化极显著( $F_{ST}=0.644, P<0.01$ ), 推测分化时间为第四纪更新世晚期。

**关键词:** 草鱼; 野生群体; D-Loop 序列; 遗传变异

中图分类号: Q346<sup>+</sup>.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)02-0349-09

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)为我国土著鱼类, 自然分布于长江、珠江及黑龙江水系等流域中<sup>[1]</sup>。草鱼在我国具有悠久的养殖历史, 其养殖产量在淡水鱼类中位居世界第一<sup>[2]</sup>。近几十年来, 由于受环境破坏及不当利用等原因<sup>[3]</sup>, 草鱼野生资源锐减并存在种质退化风险。当前, 开展良种培育是减少对草鱼野生资源过度开发和破坏, 并实现草鱼资源可持续利用的有效途径。

分子标记作为鱼类种质资源研究的有效手段<sup>[4]</sup>, 可为制定合理的育种方案提供数据参考。其中, 线粒体 DNA(mtDNA)变异可用于鱼类亲缘关系<sup>[5]</sup>、种属分类<sup>[6]</sup>、遗传分化<sup>[7]</sup>和遗传多样性<sup>[8]</sup>等研究。mtDNA 标记被广泛用于草鱼群体遗传研究中。李思发等<sup>[9]</sup>和张四明等<sup>[10]</sup>用 mtDNA 限制性片段长度多态性(RFLP)方法分别对长江中下游和中游水系草鱼群体开展了遗传变异研究; Zhao 等<sup>[11]</sup>基于 3 个线粒

体编码基因(ND5、ND6 和 Cytb)和控制区(D-Loop)序列对长江流域草鱼群体进行了遗传结构及演化进行了分析; 宋晓等<sup>[12]</sup>通过线粒体 D-Loop 区和 CO 基因序列对我国土著群体和国外移居群体进行了遗传变异分析; 李树华等<sup>[13]</sup>基于线粒体 D-Loop 和 Cytb 基因序列对长江中游草鱼亲本增殖放流的遗传效果进行了评估。此外, 诸如 RAPD<sup>[14]</sup>、TRAP<sup>[15]</sup>、ISSR<sup>[16]</sup>和 SSR<sup>[17-19]</sup>等其他分子标记被广泛用于草鱼群体遗传研究。然而, 众多研究在样本采集、研究方法及侧重点等方面存在差异, 因此具有进一步开展草鱼群体遗传结构研究的必要。

本研究对长江、珠江和黑龙江水系的 8 个草鱼野生群体的 mtDNA D-Loop 序列进行 PCR 扩增和测序, 开展了群体间遗传变异和系统分化等研究, 旨在补充完善我国草鱼野生群体的种质资源研究, 为后期遗传育种提供数据参考。

收稿日期: 2014-04-21; 修订日期: 2014-09-11

基金项目: 现代农业产业技术体系建设项目(编号: CARS-46-04); 国家科技支撑计划项目-大宗淡水主养鱼类新品种选育(编号: 2012BAD26B02); 上海市重点学科建设项目(编号: Y1101)资助

作者简介: 傅建军(1986—), 男, 浙江金华人; 博士; 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: jifu@shou.edu.cn

通信作者: 李家乐, 教授, 博士生导师; 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: jlli2009@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与 DNA 提取

草鱼 8 个野生群体收集于长江、珠江及黑龙江水系(表 1), 在前期研究<sup>[19]</sup>的基础上补充了一些个

体(2013 年 5 月)。实验样本为剪取的鳍条组织, 以无水乙醇固定。基因组 DNA 采用苯酚/氯仿法提取, 通过 1% 琼脂糖胶检测其完整性, 经 NanoDrop 分光光度仪检测其纯度及浓度。DNA 样品被稀释成 20 ng/ $\mu$ L 的终浓度, 保存于-20 备用。

表 1 草鱼样本采集信息  
Tab. 1 Sampling information of *C. idella*

群体 Population	采样地 Location	经纬度 Longitude & Latitude	样本数 No.
邗江 HJ	江苏 邗江	+119.43, +32.35	44
吴江 WJ	江苏 吴江	+120.53, +31.06	71
九江 JJ	江西 九江	+115.96, +29.72	44
石首 SS	湖北 石首	+112.39, +29.74	71
木洞 MD	重庆 木洞	+106.85, +29.57	24
万州 WZ	重庆 万州	+108.45, +30.83	48
肇庆 ZQ	广东 肇庆	+112.53, +23.08	59
嫩江 NJ	黑龙江 嫩江	+125.22, +49.21	63

### 1.2 PCR 扩增与测序

根据草鱼 mtDNA 全序列<sup>[20]</sup>(GenBank 序列号: NC\_010288)设计 D-Loop 区的引物, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物和下游引物序列分别为: DLF: 5'-CCTAGCGCCCAGAAAAGGGAGAT T-3'; DLR: 5'-GCGGGGGATTGAGGGCATACTC-3'。

PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L, 包括 10 $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)、3  $\mu$ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L、TaqDNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、上游及下游引物(10 mmol/L)各 1  $\mu$ L、基因组 DNA (20 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 补充无菌水 33  $\mu$ L。所需试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR 扩增程序为: 94 预变性 3min; 94 变性 30s, 50 复性 30s, 72 延伸 2min, 扩增 35 个循环; 72 延伸 10min; 4 保存。扩增反应在 Eppendorf 梯度 PCR 仪上完成。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 由上海迈浦生物科技有限公司通过 ABI3730XL 测序仪进行双向测序。

### 1.3 序列整理与数据分析

使用 BioEdit 7.0 软件<sup>[21]</sup>进行序列编辑, 并用 Clustal X 1.81 软件<sup>[22]</sup>进行同源比对和长度确定。采用 DnaSP 5.0 软件<sup>[23]</sup>统计多态性位点数( $S$ )、单倍型个数( $H$ )、单倍型多样性( $H_d$ )、核苷酸多样性( $\pi$ )、平均核苷酸差异数( $K$ )和 Tajima's  $D$  值等遗传多样性参数。

利用 Arlequin 3.5 软件<sup>[24]</sup>进行核苷酸组成统计、

分子方差分析(AMOVA)和遗传分化指数( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ )计算。利用 MEGA 5.1 软件<sup>[25]</sup>计算群体间的 Kimura 双参数模型(Kimura 2 Parameter, K2P)遗传距离, 并构建邻接(Neighbor-Joining, NJ)进化树。根据各采样点间的地理距离<sup>[26]</sup>, 利用 SPSS 16.0 软件<sup>[27]</sup>分析与遗传距离间的相关性。

利用 MEGA 5.1 软件对单倍型构建最大简约(Maximum Parsimony, MP)进化树, 并计算单倍型分支间的 K2P 遗传距离, 利用 Network 4.6 软件<sup>[28]</sup>构建单倍型的简约中介(Reduced-Median, MJ)网络图, 并推算单倍型分化时间。

## 2 结果

### 2.1 草鱼 D-Loop 序列的变异位点与单倍型分布

共测序获得 424 尾草鱼的 D-Loop 区(898 bp)序列。核苷酸组成显示 A+T 含量(66.71%)明显高于 G+C 含量(33.29%)。在 D-Loop 区共发现 34 个变异位点。共检测到 34 个单倍型, 其中 Hap1、Hap6、Hap20 和 Hap21 为优势单倍型, 分别占个体数的 32.31%、10.14%、28.54%和 13.21%; 20 个单倍型为除肇庆群体外的各群体所特有(表 2)。

### 2.2 草鱼野生群体遗传多样性与群体间遗传距离

我国草鱼野生群体整体单倍型多样性为 0.787(表 3)。各群体的单倍型多样性介于 0.474—0.708, 核苷酸多样性介于 0.0018—0.0037。其中, 吴

表 2 草鱼群体中的单倍型分布情况  
Tab. 2 Distribution of the haplotypes in *C. idella* populations

单倍型 Haplotype	序列号 Accession	各群体中各单倍型个体数 No. of haplotypes for each population								
		邗江 HJ	吴江 WJ	九江 JJ	石首 SS	木洞 MD	万州 WZ	肇庆 ZQ	嫩江 NJ	总体 Total
Hap1	KJ614530	26	51	27	10			23		137
Hap2	KJ614531		3	1						4
Hap3	KJ614532		1					1		2
Hap4	KJ614533		1					2		3
Hap5	KJ614534	1	1							2
Hap6	KJ614535	5	8	8	1			21		43
Hap7	KJ614536	1	2					1		4
Hap8	KJ614537		1							1
Hap9	KJ614538	1	1	1						3
Hap10	KJ614539	1	1					9		11
Hap11	KJ614540		1							1
Hap12	KJ614541	7		2						9
Hap13	KJ614542	1								1
Hap14	KJ614543	1								1
Hap15	KJ614544			1						1
Hap16	KJ614545			1				1		2
Hap17	KJ614546			1						1
Hap18	KJ614547			1				1		2
Hap19	KJ614548			1						1
Hap20	KJ614549				48	16	27		30	121
Hap21	KJ614550				6	4	18		28	56
Hap22	KJ614551					3				3
Hap23	KJ614552					1				1
Hap24	KJ614553						1			1
Hap25	KJ614554						1			1
Hap26	KJ614555						1			1
Hap27	KJ614556								1	1
Hap28	KJ614557								1	1
Hap29	KJ614558								1	1
Hap30	KJ614559								1	1
Hap31	KJ614560								1	1
Hap32	KJ614561				4					4
Hap33	KJ614562				1					1
Hap34	KJ614563				1					1

江群体的遗传多样性水平最低( $H_d=0.474$ ,  $\pi=0.0018$ ), 肇庆群体的单倍型多样性最高( $H_d=0.708$ ), 嫩江群体的核苷酸多样性最高( $\pi=0.0037$ )。群体中性检验显示, 邗江、吴江、九江和石首群体的 Tajima's  $D$  值为负值; 其余群体为正值, 其中肇庆群体显著偏离中性 ( $P<0.05$ )。

我国草鱼野生群体间 K2P 遗传距离介于 0.0020—

0.0049, 如表 4(左下角), 其中邗江与吴江群体间遗传距离最近, 嫩江与邗江群体的遗传距离最远。遗传距离与地理距离具极显著正相关( $R=0.61$ ,  $P<0.01$ , 图 1)。基于群体间 K2P 遗传距离构建 NJ 树显示, 8 个群体聚为 2 支(图 2)。其中一支由长江下游的邗江群体(HJ)、吴江群体(WJ)和九江群体(JJ)首先聚类, 再与肇庆群体(ZQ)聚类; 另一支由石首群体(SS)先

表 3 草鱼群体 D-Loop 区序列遗传多样性参数  
Tab. 3 Genetic diversity parameters of D-Loop sequence of *C. idella* populations

群体 Population	多态性位点数 <i>S</i>	单倍型数 <i>H</i>	单倍型多样性 <i>H<sub>d</sub></i>	核苷酸多样性 $\pi$	平均核苷酸差异数 <i>K</i>	Tajima's <i>D</i>
邗江 HJ	12	9	0.624	0.0022	1.945	-0.892
吴江 WJ	12	11	0.474	0.0018	1.610	-0.981
九江 JJ	12	10	0.598	0.0026	2.314	-0.488
石首 SS	13	7	0.520	0.0018	1.596	-1.152
木洞 MD	8	4	0.533	0.0027	2.377	0.351
万州 WZ	8	5	0.553	0.0033	2.965	1.774
肇庆 ZQ	8	8	0.708	0.0035	3.175	2.233*
嫩江 NJ	14	7	0.584	0.0037	3.296	0.320
总体 Total	34	34	0.787	0.0034	3.050	-1.093

注:\* 表示达到显著性水平( $P<0.05$ )

Note:\* means of statistical significant ( $P<0.05$ )

表 4 草鱼群体间的 K2P 遗传距离(左下角)和遗传分化指数  $F_{ST}$ (右上角)

Tab. 4 Pairwise K2P genetic distances (below diagonal) and fixation indexes ( $F_{ST}$ , above diagonal) among *C. idella* populations

	邗江 HJ	吴江 WJ	九江 JJ	石首 SS	木洞 MD	万州 WZ	肇庆 ZQ	嫩江 NJ
邗江 HJ		-0.0017	-0.0011	0.2944**	0.3252**	0.3475**	0.1176**	0.3801**
吴江 WJ	0.0020		0.0018	0.3057**	0.3586**	0.3820**	0.1347**	0.4135**
九江 JJ	0.0024	0.0022		0.2880**	0.2884**	0.2980**	0.0542	0.3264**
石首 SS	0.0028	0.0026	0.0030		0.0366	0.1771**	0.3393**	0.2647**
木洞 MD	0.0036	0.0034	0.0037	0.0023		0.0367	0.2780**	0.1085*
万州 WZ	0.0043	0.0041	0.0042	0.0031	0.0031		0.2389**	0.0019
肇庆 ZQ	0.0033	0.0031	0.0033	0.0040	0.0044	0.0045		0.2413**
嫩江 NJ	0.0049	0.0047	0.0047	0.0037	0.0036	0.0035	0.0048	

注:\* 表示遗传分化显著( $P<0.05$ ); \*\*表示遗传分化极显著( $P<0.01$ )

Note: \* and \*\* means of significant and extreme significant of genetic differentiation, respectively

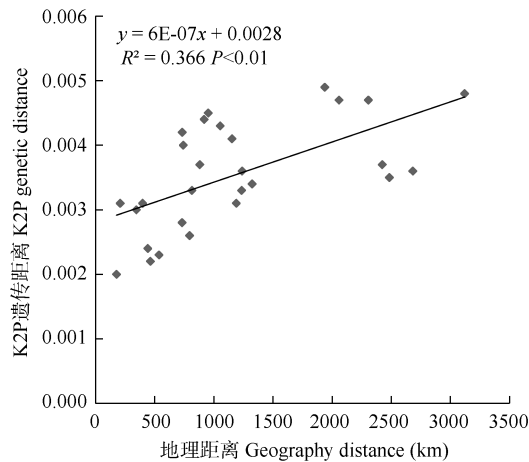


图 1 草鱼群体间 K2P 遗传距离与地理距离的散点图

Fig. 1 Scatterplot between K2P genetic and geography distances among *C. idella* populations

与长江上游的木洞群体(MD)和万州群体(WZ)聚类, 然后与嫩江群体(NJ)聚类; 最后, 以上 2 个分支聚到一起。

### 2.3 草鱼野生群体间遗传分化

我国草鱼野生群体间的遗传分化指数如表 4(右

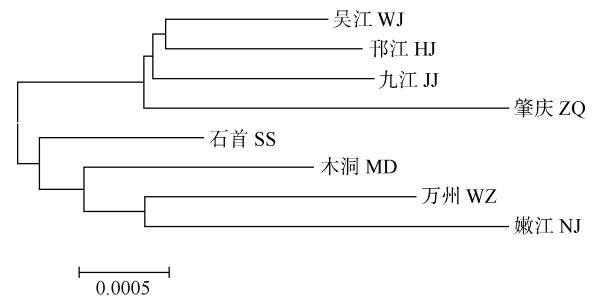


图 2 草鱼群体基于 D-Loop 序列变异的 NJ 系统树

Fig. 2 NJ tree based on D-Loop sequences of *C. idella* populations

上角)所示。其中长江下游 3 个群体(HJ、WJ 和 JJ)之间及其他 4 对群体间(JJ 与 ZQ、SS 与 MD、MD 与 WZ、及 WZ 与 NJ)遗传分化不显著( $P>0.05$ ); 其余群体间遗传分化均达显著水平( $P<0.05$ )或极显著水平( $P<0.05$ )。

基于遗传分化分析的结果, 将 8 个群体分成 5 组, 长江水系分成上游(MD 和 WZ)、中游(SS)和下游(HJ、WJ 和 JJ)流域, 及珠江流域(ZQ)和黑龙江流

域(NJ), 进行分子方差分析(AMOVA), 结果如表 5 所示, 不同流域间的方差组分占 26.24%, 遗传分化

指数  $F_{ST}$  为 0.262, 达极显著水平( $P < 0.01$ ), 说明不同水系间及长江水系不同江段间存在显著遗传分化。

表 5 草鱼群体 D-Loop 序列变异的分子方差分析(AMOVA)  
Tab. 5 Analysis of molecular variances of D-Loop sequences of *C. idella* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	百分率 Percentage of variation (%)	固定指数 Fixation indices
不同流域间 Among groups	4	144.946	0.427	26.24	0.262**
流域内群体间 Among populations within groups	3	4.953	0.0103	0.63	0.009
群体内 Within populations	416	495.073	1.1901	73.13	0.269**
总变异 Total	423	644.972	1.6274		

注: \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

Note: \*\* means of statistical extreme significant

## 2.4 草鱼单倍型的发生关系

基于草鱼单倍型构建 MP 进化树(图 3), 34 个单倍型被分为 2 个主分支(LGA 和 LGB)。其中 LGA 包含 26 个单倍型, 有 308 尾鱼, 为优势分支; LGB 包含 8 个单倍型, 有 116 尾鱼。分支间平均 K2P 遗传距离为 0.0087, 分化水平极显著( $F_{ST} = 0.644$ ,  $P < 0.01$ )。

利用单倍型构建的 MJ 网络图与 MP 进化树相吻合(图 4)。2 个分支各有 2 个优势单倍型, 并具有一定的地域性; 其中 2 个为长江中下游 4 个群体和肇庆群体所有, 另外 2 个为长江中上游 3 个群体和嫩江群体所有。估算 4 个优势单倍型间的分化时钟, 不同分支的优势单倍型间分化时间介于距今 51077—28924 年前, 分支内优势单倍型间分化时间介于距今 11414—9464 年前, 依此推测 2 个单倍型分支的分化大约发生在第四纪更新世晚期。

## 3 讨论

### 3.1 草鱼 D-Loop 区的变异特征

本研究对草鱼 D-Loop 区序列分析表明, A+T 含量达到 66.71%, 明显高于 G+C 含量, 这与 Zhao 等<sup>[11]</sup>在草鱼中研究发现 66.8% 的 A+T 含量相符合。研究发现草鱼 D-Loop 区 34 个变异位点, 34 个单倍型, 高于 Zhao 等<sup>[11]</sup>利用 4 个 mtDNA 序列的研究结果, 而与宋晓等<sup>[12]</sup>的研究结果相似。分析造成本研究中草鱼 D-Loop 区多态性较高的原因, 与所用群体数及样本数较多有关。对比 Zhao 等<sup>[11]</sup>的研究, 其样本数尽管不多, 但其单倍型多样性水平与本文差异不大, 分析采用更多序列片段易于检测到较多突变位点和

单倍型。因此, 在样本数充足的情况下, 可只用 D-Loop 区等序列开展遗传变异分析, 以降低实验成本; 而当样本量不太充足时, 建议增加 mtDNA 序列片段来开展群体遗传研究。

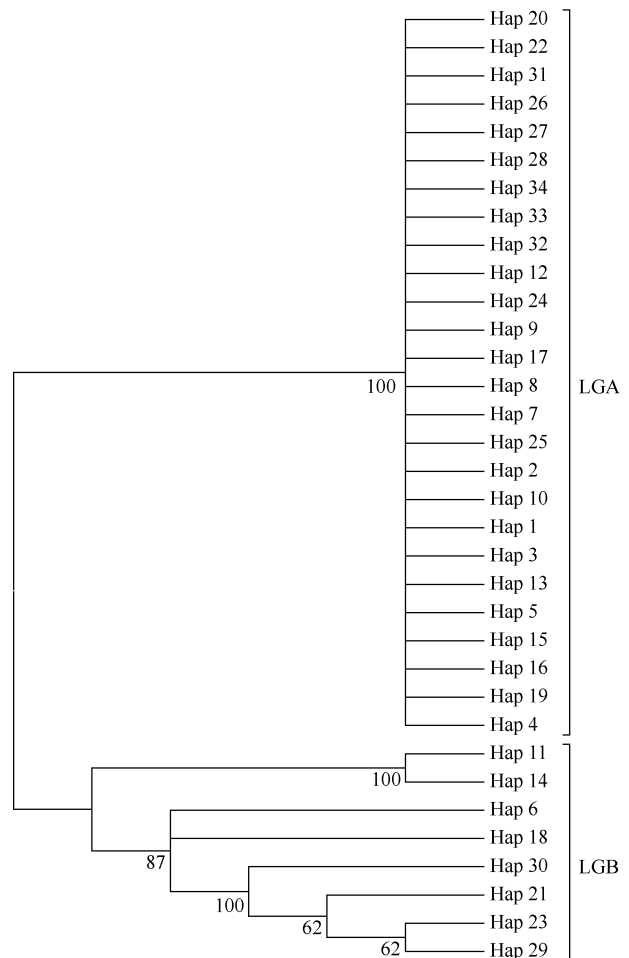


图 3 草鱼 31 种单倍型的 MP 系统树

Fig. 3 MP phylogenetic tree of 31 haplotypes of grass carp

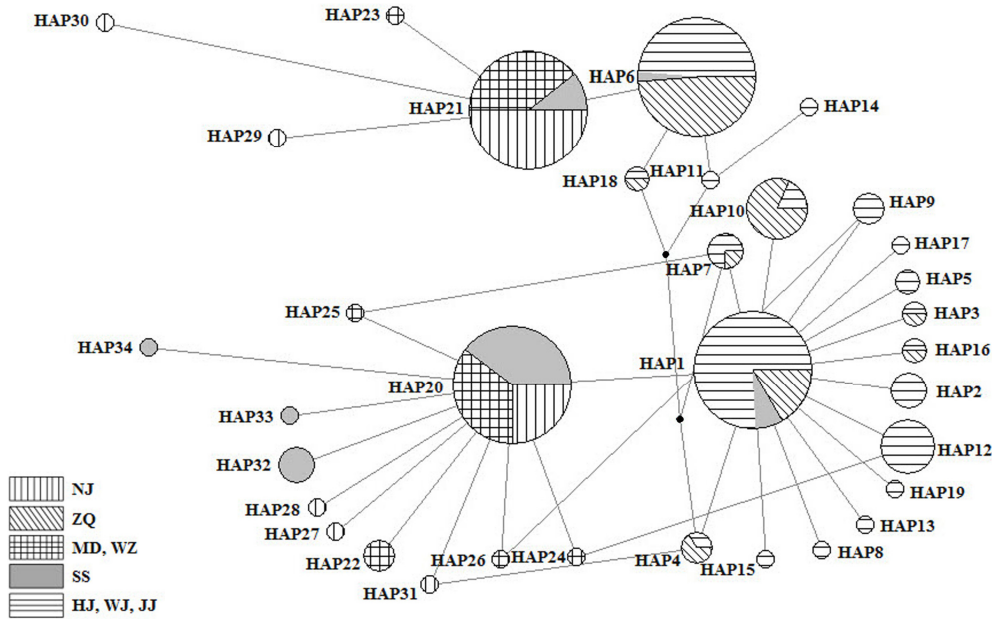


图4 草鱼 mtDNA D-Loop 区 34 个单倍型的网络结构图

Fig. 4 The haplotypes network of mtDNA D-Loop region of grass carp

### 3.2 我国草鱼野生群体遗传多样性

在本研究中我国草鱼野生群体, 呈现较高的单倍型多样性, 说明我国草鱼野生资源具有较高遗传多样性。各群体的单倍型多样性水平与 Zhao 等<sup>[11]</sup>和李树华等<sup>[13]</sup>对长江水系的草鱼群体及宋晓等<sup>[12]</sup>对中国土著群体的研究结果相类似, 明显高于宋晓等<sup>[12]</sup>研究中日本群体(Tong)和美国群体(MSB)的单倍型多样性, 这与旅居群体的原始亲本较少有关。比较基于线粒体多态性的草鱼群体遗传研究, 发现结果不尽相同; 李思发等<sup>[9]</sup>和张四明等<sup>[10]</sup>利用基于片段长度多态性的 RFLP 技术检测到的单倍型数目明显少于 Zhao 等<sup>[11]</sup>和宋晓等<sup>[12]</sup>利用基于序列突变位点而确定的单倍型数, 可能与检测技术和研究群体等的差异有关。

本次研究表明吴江群体单倍型多样性最低, 推测可能与太湖流域悠久的圩田开发历史<sup>[29]</sup>有关, 原有水生资源的不断破坏, 导致遗传多样性降低, 可能也是廖小林等<sup>[30]</sup>认为草鱼群体存在“隐蔽瓶颈效应”现象<sup>[31]</sup>的原因。长江水系中上游群体的遗传多样性水平较低, 推测与其特殊的水文条件和水利设施有关<sup>[32]</sup>。长江流域部分野生群体呈现相对较低的单倍型多样性水平, 可能还受各江段原种场运营模式及常年增殖放流等因素影响; 尽管李树华等<sup>[13]</sup>在相关研究中未发现放流模式对野生群体的遗传多样性和遗传结构产生明显的影响, 但是近年来长江

流域的增殖放流对草鱼野生种质资源的影响应该受到重视。在研究中肇庆群体的单倍型多样性最高, 与宋晓等<sup>[12]</sup>研究发现中国土著群体中珠江群体单倍型多样性最高相符, 与我们前期研究中发现肇庆群体等位基因数最多相吻合<sup>[19]</sup>, 这可能与珠江流域温暖适宜的水域环境有关。长江下游 2 个群体(HJ 和 JJ)分布于长江干流, 拥有广阔的水域环境及适宜的水文条件, 可能导致其单倍型多样性略高于嫩江群体和长江上游群体, 与宋晓等<sup>[12]</sup>的部分研究结果相似。

### 3.3 我国草鱼系统演化和群体间遗传分化

本研究 4 个优势单倍型在石首群体中均有分布, 可为草鱼起源于第三纪后期的上新世的长江中游<sup>[1]</sup>提供分子证据, 而长江于早更新世晚期才从三峡东西贯通<sup>[33]</sup>, 草鱼从而由中游扩散分布于整个长江水系。4 个优势单倍型分为 2 支并具有一定地域性分布, 推测是在地貌变化和种群演化两方面因素影响下形成。2 个分支的分化时间推算发生于第四纪更新世晚期, 可能是冰期和间冰期交替导致地理隔离与融合造成<sup>[34]</sup>单倍型分化。2 个分支内表现地域性差异, 其分化时间与中国主要水系形成时期(1.2—1.0 百万年前)<sup>[33]</sup>相吻合, 这可能是物种在扩散中的选择和保留; 其中一个分支由长江中游经长江下游往珠江水系方向演化, 而另一个分支则由长江中游向长江上游和经过江河平原向古嫩辽河扩散演化, 这符合对珠江水系和黑龙江水系草鱼种群的起源推测<sup>[1]</sup>。

长江、珠江和黑龙江水系的草鱼在经历长期的演化过程后发生了显著遗传分化。在长江水系内部, 下游 3 个群体间遗传距离最近, 遗传分化不显著, 与李思发等<sup>[9]</sup>、张四明等<sup>[10]</sup>及 Zhao 等<sup>[11]</sup>的研究结果相符合; 中游的石首群体与下游和上游 2 个群体遗传距离接近, 大部分群体间存在显著遗传分化, 与 Zhao 等<sup>[11]</sup>研究发现长江水系不同江段无显著遗传分化不尽相同, 群体间遗传距离与地理距离呈正相关, 与我们基于微卫星标记的研究结果相符<sup>[19]</sup>。肇庆群体与长江下游 3 个群体间的遗传距离较近, 与除九江群体外的其他群体呈极显著的遗传分化。一方面支持珠江水系草鱼起源于长江中下游草鱼种群扩散的说法<sup>[1]</sup>, 也可能与灵渠沟通湘江(长江支流, 有草鱼产卵场分布<sup>[9]</sup>)和漓江(珠江支流)有关; 另一方面说明珠江水系草鱼种群在长期的适应过程中累积了特异的遗传资源。相对其他群体, 嫩江群体与长江上游 2 个群体的遗传距离最近, 在优势单倍型上也具有明显的共享现象; 根据相关文献<sup>[35, 36]</sup>, 两者的地貌及河流坡降等方面具有相似之处, 而 Zhang 等<sup>[37]</sup>发现水文情势与草鱼的繁殖行为密切相关, 是否相近的环境导致群体间的遗传相似还有待进一步研究。

木洞、万州、肇庆及嫩江 4 个群体呈现相对较高的核苷酸多样性及平均核苷酸差异数, 这可能是在种群进化中平衡选择<sup>[38]</sup>的结果, 通过保留更多遗传多样性, 维持种群较高的适合度。以上 4 个群体的中性检验<sup>[39]</sup>显示可能经历不同程度遗传瓶颈效应, 与我们利用微卫星的研究结果相符<sup>[19]</sup>, 推测在草鱼种群演化过程中, 地貌变化促进草鱼物种扩散并造成单倍型分化的同时, 气温变化、环境恶劣也抑制了草鱼种群过度繁衍。

#### 参考文献:

- [1] Shen Y B, Zhang J B, Li J L. Advances in studies on genetic resources of grass carp [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, **27**(7): 369—373 [沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. 中国农学通报, 2011, **27**(7): 369—373]
- [2] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012 [M]. Rome, 2012, 209
- [3] Liu S P, Duan X B, Chen D Q, et al. Studies on status of fishery resources in the middle reach of the Yangtze River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(6): 708—711 [刘绍平, 段辛斌, 陈大庆, 等. 长江中游渔业资源现状研究. 水生生物学报, 2005, **29**(6): 708—711]
- [4] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Aquaculture*, 2004, **238**(1—4): 1—37
- [5] Lu X, Wang H, Liu B, et al. An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and COI markers [J]. *Aquaculture*, 2011, **318**(1—2): 223—228
- [6] Mishina T, Takada M, Takeshima H, et al. Molecular identification of species and ploidy of *Carassius* fishes in Lake Biwa, using mtDNA and microsatellite multiplex PCRs [J]. *Ichthyological Research*, 2014, **61**(2): 169—175
- [7] Mabuchi K, Miya M, Senou H, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of the Lake Biwa wild strain of common carp (*Cyprinus carpio* L.): further evidence for an ancient origin [J]. *Aquaculture*, 2006, **257**(1—4): 67—77
- [8] Hu J, Hou X Y, Yin S W, et al. Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the south China sea revealed by *Co* and *Cyt b* gene analyses [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(6): 1008—1016 [胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于 mtDNA *CO* 和 *Cytb* 基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究. 水生生物学报, 2014, **38**(6): 1008—1016]
- [9] Li S F, Lü G Q, Bernatchez L. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle- and lower reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, **44**(1): 82—93 [李思发, 吕国庆, 贝纳切兹 L. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析. 动物学报, 1998, **44**(1): 82—93]
- [10] Zhang S M, Wang D Q, Deng H, et al. Mitochondrial DNA variations of silver carp and grass carp in populations of the middle reaches of the Yangtze River revealed by using RFLP-PCR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(2): 142—147 [张四明, 汪登强, 邓怀, 等. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 142—147]
- [11] Zhao J, Cao Y, Li S, et al. Population genetic structure and evolutionary history of grass carp *Ctenopharyngodon idella* in the Yangtze River, China [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2011, **90**(1): 85—93
- [12] Song X, Li S F, Wang C H, et al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) genetic structure analysis among native populations in China and introduced populations in USA, Europe and Japan based on mitochondrial sequence [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(4): 709—716 [宋晓, 李思发, 王成辉, 等. 草鱼中国土著群体与欧美日移居群体遗传差异的线粒体序列分析. 水生生物学报, 2009, **33**(4): 709—716]
- [13] Li S H, Chen D Q, Duan X B, et al. Genetic effects of released mature *Ctenopharyngodon idellus* on natural

- populations based on the mitochondrial DNA markers in the middle reaches of the Yangtze River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, **44**(3): 45—50 [李树华, 陈大庆, 段辛斌, 等. 基于线粒体 DNA 标记的长江中游草鱼亲本增殖放流的遗传效果评估. *淡水渔业*, 2014, **44**(3): 45—50]
- [14] Xue G, Liu J, Liu J. RAPD analysis of grass carp population in three-river waters [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, **5**(1): 1—5 [薛国雄, 刘棘, 刘洁. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析. *中国水产科学*, 1998, **5**(1): 1—5]
- [15] Zhang Z, Cao Z, Zhou J, *et al.* Genetic structure analyses of different populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using the TRAP technique [J]. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, **4**(1): 27—32
- [16] Chen Q, Wang C, Lu G, *et al.* Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from native and colonized regions using ISSR markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, **37**(5): 549—555
- [17] Liu F, Xia J, Bai Z, *et al.* High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis [J]. *Aquaculture*, 2009, **297**(1—4): 51—56
- [18] Chen Q, Wang C, Lu G, *et al.* Microsatellite genetic diversity and differentiation of native and introduced grass carp populations in three continents [J]. *Genetica*, 2012, **140**(4—6): 115—123
- [19] Fu J J, Li J L, Shen Y B, *et al.* Genetic variation analysis of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers [J]. *Hereditas*, 2013, **35**(2): 192—201 [傅建军, 李家乐, 沈玉帮, 等. 草鱼野生群体遗传变异的微卫星分析. *遗传*, 2013, **35**(2): 192—201]
- [20] Wang C, Chen Q, Lu G, *et al.* Complete mitochondrial genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Teleostei): insight into its phylogenetic position within Cyprinidae [J]. *Gene*, 2008, **424**(1—2): 96—101
- [21] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1998, **41**: 95—98
- [22] 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
- [23] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messenguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(18): 2496—2497
- [24] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**(3): 564—567
- [25] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2731—2739
- [26] Karney C F F. Algorithms for geodesics [J]. *Journal of Geodesy*, 2013, **87**(1): 43—55
- [27] Cleophas T J, Zwinderman A H. SPSS for Starters [M]. Springer, Dordrecht New York Heidelberg London. 2009, 15—19
- [28] Network 4.6.1.1. User Guide. www.fluxs-engineering.com
- [29] Zhuang H F. Cultivation of diked paddy-fields in ancient south-east China and their effects on ecological environment [J]. *Journal of Chinese Historical Geography*, 2005, **20**(3): 87—94 [庄华峰. 古代江南地区圩田开发极其对生态环境的影响. *中国历史地理论丛*, 2005, **20**(3): 87—94]
- [30] Liao X L, Yu X M, Tan D Q, *et al.* Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 113—119 [廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析. *水生生物学报*, 2005, **29**(2): 113—119]
- [31] Luikart G, Sherwin W B, Steele B M, *et al.* Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change [J]. *Molecular Ecology*, 1998, **7**(8): 963—974
- [32] Wang S Y, Liao W G, Chen D Q, *et al.* Analysis of eco-hydrological characteristics of the four Chinese farmed carps' spawning grounds in the middle reach of the Yangtze River [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2008, **17**(6): 892—897 [王尚玉, 廖文根, 陈大庆, 等. 长江中游四大家鱼产卵场的生态水文特性分析. *长江流域资源与环境*, 2008, **17**(6): 892—897]
- [33] Li C A, Zhang Y F. Geoscientific factors analyses on the through cutting of main drainages and the formation of flood damage in China [J]. *Exploration of Nature*, 1997, **16**(59): 61—65 [李长安, 张玉芬. 中国主要水系贯通和洪灾形成的地学因素分析. *大自然探索*, 1997, **16**(59): 61—65]
- [34] Shi Y. Characteristics of late Quaternary monsoonal glaciation on the Tibetan Plateau and in East Asia [J]. *Quaternary International*, 2002, (97—98): 79—91
- [35] Xu D X, Zhang G X, Yin X R. Runoff variation and its impacting factor in Nenjiang River during 1956—2006 [J]. *Advances in Water Science*, 2009, **20**(3): 416—421 [徐东霞, 章光新, 尹雄锐. 近 50 年嫩江流域径流变化及影响因素分析. *水科学进展*, 2009, **20**(3): 416—421]
- [36] Huang S. Upper Yangtze River annual runoff analysis and its forecast [D]. Thesis for Doctor of Science. Sichuan University, Chengdu. 2006 [黄胜. 长江上游干流区径流变化规律及预测研究. 博士学位论文, 四川大学, 成都. 2006]
- [37] Zhang G, Chang J, Shu G. Applications of factor-criteria system reconstruction analysis in the reproduction research on grass carp, black carp, silver carp and bighead in the Yangtze River [J]. *International Journal of General Systems*, 2000, **29**(3): 419—428
- [38] Biswas S, Akey J M. Genomic insights into positive



selection [J]. *Trends in Genetics*, 2006, **22**(8): 437—446  
[39] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation

hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**(3): 585—595

## GENETIC VARIATION ANALYSIS BASED ON D-LOOP SEQUENCES OF WILD POPULATIONS OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*) IN CHINA

FU Jian-Jun<sup>1,2</sup>, WANG Rong-Quan<sup>3</sup>, SHEN Yu-Bang<sup>1</sup>, XUAN Yun-Feng<sup>3</sup>, XU Xiao-Yan<sup>1</sup>,  
LIU Cheng-Chu<sup>2</sup> and LI Jia-Le<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Postdoctoral Research Station of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Conventional Freshwater Fish Breeding and Health Culture Technology Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Suzhou Wujiang Area Aquaculture Limited Company, Suzhou 215221, China)

**Abstract:** In this study we analyzed the genetic variations in the mtDNA D-Loop sequences of eight wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) including six populations (Hanjiang, Wujiang, Jiujiang, Shishou, Mudong, and Wanzhou) from the Yangtze River, the Zhaoqing population from the Pearl River, and the Nenjiang population from Heilongjiang River. A total of 34 variable sites and 34 haplotypes were detected in 424 individuals, and the haplotype diversity ranged from 0.474 to 0.708 among the eight populations. The pairwise population K2P genetic distances were between 0.0020 and 0.0049. The genetic distance between the three populations from the lower reach of the Yangtze River was the closest and their genetic differences were insignificant ( $P>0.05$ ). The Zhaoqing population also showed a close genetic distance with the three populations from the lower reach of the Yangtze River; and it did not have significant genetic differences compared to the Jiujiang population ( $P>0.05$ ). The Nenjiang population displayed a close genetic distance with the two populations from the upper reach of the Yangtze River. The genetic difference between the Nenjiang population and the Wanzhou population ( $P>0.05$ ) was insignificant. Furthermore we observed an extreme significant correlation between the genetic distance and the geographic distance ( $P<0.01$ ). The AMOVA analysis suggested that there were highly significant differences between populations ( $P<0.01$ ), and that the genetic variation among different watersheds in China accounted for 26.24% of the total variation. The haplotypes divided into two major branches which exhibited remarkable evolutionary differences ( $F_{ST}=0.644$ ,  $P<0.01$ ), and this branching might originate in the late Pleistocene.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; Wild population; D-Loop sequence; Genetic variation