

不同地理群体乌鳢线粒体 DNA 控制区 结构分析及遗传多样性

董新培¹, 穆淑梅¹, 周楠¹, 康现江^{1*}, 罗青², 白俊杰²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071000;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 为研究乌鳢群体的遗传多样性和控制区结构, 实验采用 PCR 和 DNA 测序技术对其线粒体 DNA 控制区序列进行比较。结果显示, 用于分析的线粒体 DNA 控制区全长序列为 905 ~ 908 bp。104 个序列中共发现了 37 个多态位点, 定义了 27 种单倍型。同时对控制区结构进行分析, 识别了其终止序列区 (ETAS)、中央保守区 (CD) 和保守序列区 (CSB) 的关键序列。3 个地理群体的单倍型多样性 (H_d)、核苷酸多样性 (P_i) 和平均核苷酸差异数 (k) 分别为 0.875、0.003 27 和 2.939。群体间的平均 Kimura 双参数遗传距离 (Kimura 2-parameter distance, K_{2-P})、遗传分化指数 (F_{st})、基因交流值 (N_m) 和分子方差分析 (AMOVA) 均表明, 3 个乌鳢群体具有较高的遗传分化, 白洋淀群体和平原县群体间存在一定的基因交流。

关键词: 乌鳢; 线粒体 DNA 控制区; 遗传多样性

中图分类号: Q 346⁺.5; S 965.1

文献标志码: A

乌鳢 (*Channa argus*), 隶属鲈形目 (Perciformes)、鳢科 (Channidae)、鳢属 (*Channa*), 原产于中国、俄罗斯和韩国, 通常栖息于水草丛生、底泥细软的静水或微流水中。目前, 中国乌鳢主要分布在长江流域和黑龙江流域的大部分地区^[1-2]。乌鳢有生肌补血等药用价值, 且肉嫩刺少, 加上适应性强, 具有较高的经济价值^[3]。如今, 由于过度捕捞、环境污染及其他因素的影响, 导致野生群体数量下降很快。乌鳢为肉食性鱼类, 养殖成本相对较高, 因此, 为了保护物种和充分利用其自然资源, 人们将斑鳢 (♀) 与乌鳢 (♂) 进行杂交, 以期获得生产性状方面比亲本更优的新品种^[4]。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是线粒体内的核酸成分, 具有分子结构简单, 编码效率高, 进化速率快, 严格母系遗传, 几乎不发生重组等特点^[5]。线粒体 DNA 控制区 (control

region) 又称 D-环区 (displacement loop region, D-Loop), 是整个线粒体 DNA 基因组序列和长度变异最大的区域, 进化速率是其他序列的 5 ~ 10 倍, 积累了较多的突变, 如碱基替换、插入或缺失, 和众多的串联重复序列^[6-7]。通过检测该区域的 DNA 变异可以有效地探讨近缘种间和种内或个体间遗传变异关系。因此, 本实验利用线粒体 D-Loop 区分析不同地理群体野生乌鳢的遗传差异, 有利于全面了解不同地区乌鳢群体的多样性, 为乌鳢的遗传育种、渔业资源的有效保护及可持续发展提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的乌鳢样品分别取自河北省白洋淀、山东省平原县和湖南省洞庭湖。白洋淀和平原县的样品为活鱼, 运回实验室后解剖取背部肌

收稿日期: 2014-06-09 修回日期: 2014-07-05

资助项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD26B03)

通信作者: 康现江, E-mail: xjkang@hbu.edu.cn

肉,冻存于-80℃冰箱保存备用。洞庭湖的样本实验室存于-20℃冰箱保存备用。
为当地取材,取其部分尾鳍用无水乙醇固定,带回

表 1 乌鳢的采集地点及数量
Tab.1 Sampling sites and quantities of *C. argu* in this study

采集地 collection places	经纬度 latitude and longitude	缩写 abbreviation	数量/尾 quantity	取样部位 sampling part
河北省白洋淀 Baiyangdian of Hebei Province	38°92'N,115°92'E	BW	30	肌肉 muscle
山东省平原县 Pingyuan of Shandong Province	37°16'N,116°44'E	PW	31	肌肉 muscle
湖南省洞庭湖 Dongting Lake of Hunan Province	28°83'N,112°36'E	DW	43	尾鳍 tail fin

1.2 乌鳢总 DNA 的提取

每尾乌鳢取肌肉或尾鳍样品 20~30 mg。采用蛋白酶 K 进行消化,按常规酚-氯仿抽提法提取总 DNA,得到的 DNA 用双蒸水充分溶解,并通过琼脂糖凝胶电泳检测浓度,存于-20℃保存备用。

1.3 乌鳢线粒体控制区 PCR 扩增及序列测定

扩增乌鳢线粒体 D-Loop 区的引物参照黄志坚等^[8]的淡水鱼通用引物,引物序列:MitD1-F(5'-CACCCYTRRCTCCCAAAGCYA-3')和 MitD1-R(5'-GGTGCGGRKACTTGATGTRTAA-3'),分别位于 tRNA^{Pro}和 12S rRNA 上。送上海生工生物工程有限公司进行合成。PCR 反应体系为 50 μL,其中含有 10×Buffer 5 μL、dNTP 1 μL(10 mmol/L)、2 种引物各 2 μL(10 μmol/L)、Taq DNA 聚合酶 1 U、模板 DNA 50 ng、加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 扩增程序:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,54℃退火 50 s,72℃延伸 3 min,33 个循环,最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,送上海生工生物工程有限公司双向测序,使用 PCR 扩增引物作为测序引物。

1.4 数据分析

使用 Clustal X 1.83^[9]比对测序结果,辅以人工校对。利用 MEGA 5.0^[10]软件统计序列的碱基含量及遗传距离;利用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)基于 Kimura 双参数(Kimura 2-parameter, K 2P)模型构建乌鳢群体系统进化树,进化树各分支的自举置信度水平由自举法(Bootstrap value)估计,自引导次数为 1 000。通过 DnaSP(version 5.0)^[11]软件统计单倍型(*h*)、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*);用 Arlequin 3.1^[12]中的 AMOVA 分析方法估算群体内和群体间的分化指数(*F_{st}*),并计算种群间基因流 *N_m*(*N_m*=1-*F_{st}*/4*F_{st}*)。

statistics, *F_{st}*),并计算种群间基因流 *N_m*(*N_m*=1-*F_{st}*/4*F_{st}*)。

2 结果

2.1 线粒体 D-Loop 区序列碱基组成与变异分析

经序列测定获得的乌鳢线粒体 D-Loop 基因全序列的长度为 905~908 bp,其中包括 5 个缺失/插入位点,长度变异较小。通过对 3 个野生群体的碱基组成分析发现,3 个群体的碱基组成基本无差异,整体表现为 A+T 的含量明显高于 C+G 的含量,具有碱基偏倚性(表 2)。通过对 3 个群体 104 个个体线粒体 D-Loop 基因全序列的分析,共检测到 37 个变异位点,占分析位点总数的 4.07%,碱基转换/颠换比值(TS/TV)为 2.38。

表 2 乌鳢群体线粒体 D-Loop 区碱基组成
Tab.2 Nucleotide compositions of mtDNA control region in *C. argu*

群体 population	碱基 base						%
	A	T(U)	C	G	A+T	C+G	
BW	33.89	27.46	22.77	15.88	61.29	37.81	
PW	33.89	27.46	22.77	15.88	61.35	38.65	
DW	33.84	27.61	22.73	15.83	61.44	38.56	
总体 total	33.86	27.54	22.74	15.89	61.37	38.63	

根据乌鳢线粒体 DNA D-Loop 基因全序列的变异情况,3 个野生群体的 104 个样本中共定义了 27 种单倍型(表 3),其中 BW 群体单倍型数量为 4, PW 群体单倍型数量为 5, DW 群体则拥有 20 个单倍型。单倍型在群体间的差异性较大,每个群体都有各自的单倍型,其中 Hap9 和 Hap11 为 BW 和 PW 群体共享单倍型,分别出现在 23 和 20 个个体中,而 DW 群体与其他两个群体间无共享单倍型。

表 3 乌鳢 3 个野生群体 mtDNA D-loop 区序列差异定义的单倍型及单倍型分布
Tab.3 Haplotype made from the mtDNA D-Loop sequence of wild *C. argu* in three populations and haplotypes in different geographical distribution of populations

	111122222233446612423699800921334888	单倍型地理分布			
		haploid type distribution			
		BW	PW	DW	Total
	8346801247891558067106940495837001316	30	31	43	104
Hap_1	-AT-TCATTACAAAAGAAGTGTCCGTGTTAAGGCATC	0	0	4	4
Hap_2	-...-.....T.....	0	0	1	1
Hap_3	-...-.....TG...	0	0	1	1
Hap_4	-...-T.....GT.....	0	0	1	1
Hap_5	-...-T.....GTT.C.....	0	0	1	1
Hap_6	-...-T.-T.....T.....	0	0	1	1
Hap_7	-...-G.C.TC.....	0	0	1	1
Hap_8	-...-TT.G.-.....G...	0	0	1	1
Hap_9	-...-.....T.....CG.....G...	1	22	0	23
Hap_10	-...-.....T.....T.....CG.....G...	0	1	0	1
Hap_11	-...-.....C.....G...	15	5	0	20
Hap_12	TGA-.....C.....G...	0	2	0	2
Hap_13	--A-G.....C.....G...	0	1	0	1
Hap_14	-...-.....A..C.....G...	1	0	0	1
Hap_15	-...-.....G...	0	0	17	17
Hap_16	-...-.....C.....A..G...	0	0	2	2
Hap_17	-...-.....T.....G...	0	0	1	1
Hap_18	-...-.....C.....G...	0	0	1	1
Hap_19	-...-.....A.....G...	13	0	0	13
Hap_20	-...-.....A.....T...G...	0	0	2	2
Hap_21	-...-.....A.....T.TGG...	0	0	1	1
Hap_22	-...-.....A.....T.TGG.A	0	0	1	1
Hap_23	-...-.....A.....G...	0	0	1	1
Hap_24	-...-.....A.....G...	0	0	1	1
Hap_25	-...T.....A.....GC.	0	0	3	3
Hap_26	-...-G.....T.....A.....GC.	0	0	1	1
Hap_27	-...-GC.G..CCTT.....A.....TGGC.	0	0	1	1

注:每列数字表示同源比对测序获得的 104 条野生乌鳢的 D-loop 区域序列后在差异位点的核苷酸情况;圆点(.)表示在相应位点上与第一种单倍型有相同的碱基组成,横线(-)表示与第一种单倍型相比缺失的碱基。
Notes:Each column in the figure represented the nucleotide sequence mutation loci,used homology analysis of 905 – 908 bp D-loop sequence between the 104 wild *C. argu* populations;ot(.) mean that the base in the corresponding base sites is the same with the first haplotype. Dash(-) means that the base site is the missing compared with the first haploid type.

2.2 乌鳢线粒体 D-Loop 区结构分析

综合对比不同鱼类线粒体 DNA 控制区结构^[13-19],对乌鳢该控制区的结构进行分析,识别了终止序列区、中央保守区、保守序列区 3 个区域(图 1)。

终止序列区 终止序列区(termination associated sequence domain,TAS)是线粒体 D-Loop 区变异最大的区域,包含与 DNA 复制终止相关的序列 ETAS。拷贝数在种间和种内个体间都存在差异。一般每个重复序列中都含有一个保守的 ETAS。在不同的物种中 ETAS 的变异较大,其主体的核心序

列是 TACAT 和它的反向互补序列 ATGTA,形成稳定的发卡结构。由刘焕章^[13]确定的鱼类中的 ETAS 序列:TACATAT-----ATGTATTATCACCATATA-TTATATTAACAT(“-”表示发生变异的碱基,即转换,颠换或缺失,下同)。本实验识别到的乌鳢的终止序列区含有 3 个 TACAT 核心序列,2 个与 TAS 互补序列(ATGTA),全长 268 bp,其中包含 24 个变异位点,变异率为 8.96%。

中央保守区 中央保守区(central domain,CD)是线粒体 D-Loop 区最为保守的区域。本实验识别了乌鳢的中央保守区,为 269 ~ 625 bp,全

长共 356 bp,在该范围内共发现 6 个变异位点,变异率为 0.169%。目前所报道的鱼类控制区序列,大部分只识别了中央保守区的 3 个保守序列 CSB-F、CSB-E 和 CSB-D,其中 CSB-F 最靠近 5'端,被认为是区分终止序列和中央保守序列的标志,其序列为 ATGTAAGTAAAGACCGACCATCAGTTGAT;紧接其后的是 CSB-E 和 CSB-D,序列分别为 TCAGGGACA--AATTGTGGGGGT 和 TATTCCTGGCATTGTTTCCTA-TTCA,识别 CSB-E 的主要标志为 GTGGG-box^[14]。本研究识别的乌鳢中央保守区亦含有 CSB-F、CSB-E、CSB-D 3 个保守序列,且未发现除此之外的其他序列。

保守序列区 保守序列区 (Conserved sequence block domain, CSB) 包含 3 个保守序列

CSB1、CSB2 和 CSB3,其中 CSB1 变异较大,刘焕章^[13]在对哺乳动物和鱼类的序列作对比以识别鳊鱼类的 CSB1 时,发现其中的 GACATA 特征序列,可以用于识别 CSB1 的存在;而朱世华等^[15]在识别鲮科鱼类保守区时,并未找到该特征序列,却发现一个类似的特征序列:GAGCATA,从而识别到鲮科鱼类 CSB1。本研究以鲮科鱼类特征序列为标志识别了乌鳢的 CSB1,序列为 CAT--TAGGTTATCAAGAGCATAA,在乌鳢种群样本中有 2 个位点发生变异。鱼类中 CSB2 和 CSB3 较为保守,容易识别,CSB2 序列为 TTAAACCCCCCTA-CCCCC;CSB3 序列为 TGAAACCCCCCGGAAAACAGGAAA;这 2 个序列在乌鳢种群样本中均有一个位点发生变异。

```

5'-TCAAAGAAAGGAGATTTTAACTCCCGCCCCTAACTCCCAAAGCTAGGATTCTAATTTAACTA
TTCTTTGTACATATTATGGGAATTCCATATATACATACATGTACATACATAGGGGACATACTAAC
ETAS
AAATAGTACATATATGTATTATAAAACATACATTTATTTAGTCCATACAAGCAATGAAGTTAATGT
ACGTCTTACATAGAAACAACTGTCCTTTACTCAAAATTAACACCTTGTAATTAATTAAGAA
ATTTAAAGCACTCCACACTAATAGAATAAGTAATCTCATACCACACCCAACATCCAATTTGAAA
终止序列区→中央保守区
CAATTACTTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATACGGTTATTGATGGTC
CSB-F
AGGGACAGAAATTGTGGGGGTTTCACAGAATGAACATATCCTGGCATTGTTTCCTACTTCAGG
CSB-E CSB-D
GCCATATCTTGACTGATTCTCACACTTTTCTTGACGCTTACATTGGTTAATGGTGGTAAACAATT
GACTCGTTACCCAACATGCCGGGCGTTCTCTCCACGGGGGTCAGGGGTTTTCCTTTTGTCTT
CCTTTCACTTTGCATTTCAGAGTGCGCACGGTAATAACAGTCAAGGGTGATACATTTCCTTGTAAG
中央保守区→保守序列区
AGTATTAATGATGAAGGGTGGAAAGACATAACCTGTAGAATTGCATAATAGGTTATCAAGAGCAT
CSB1
AAGATGAAATAATTTCCCTAACATACCTAAGACGCCCCCTTCTCGGGTTAGAGGGGTTAAACC
CSB2
CCCTACCCCCCTAACTACTGAGATCCTTAACAATCCTGTAAACCCCCCGGAAAACAGGAAAAAC
CSB3
CCCTAGCAGTAAATAGGCAAAAATATAAAAAATCGCAACATAGGCTTCAACTAGCCCCACAAC
TCGGGACATAACTACCACCACACGCCAACCCAAAGACCATCACCTAAATATTACAATATTAC
GCACA-3'

```

图 1 乌鳢线粒体 D-Loop 区全序列

Fig. 1 The control region and tRNA^{pro} gene complete sequence of *C. argu*

2.3 乌鳢不同地理群体遗传多样性和遗传分化

在 3 个群体中,洞庭湖群体的变异位点、核苷酸多样性和平均核苷酸差异数均为最高值,其中洞庭湖乌鳢群体具有较高的单倍型多样性(0.855),而白洋淀和平原县群体的单倍型多样性仅为 0.579 和 0.480(表 4)。由此可见,洞庭湖群体是 3 个群体中遗传多样性较丰富的群体,白

洋淀和平原县群体的相关遗传多样性参数则较低,遗传多样性处于较低水平。

根据 Kimura 双参数(Kimura 2-parameter)模型,计算 3 个群体内与群体间的平均遗传距离,将 3 个群体作为一个整体,所有个体间平均遗传距离为 0.003 28。洞庭湖群体内个体间的遗传差异最大为 0.003 00,白洋淀群体内个体间的遗传差

异最小为 0.001 44。3 个野生群体间的遗传距离均小于 0.01,遗传距离最大的洞庭湖和平原县群体也仅为 0.004 59。由此可以看出,河北白洋淀、山东平原县以及洞庭湖 3 个野生乌鳢群体间没有表现出明显的地理隔离。

3 个地理群体的分子 AMOVA 分析结果表

明,群体间的变异为 31.91%,种内个体间的变异为 68.09% (表 5)。种内的变异明显大于群体间的变异,表明 3 个乌鳢群体绝大部分遗传变异发生在种内,并不是群体间。总的群体间分化系数 F_{st} 值为 0.319 14 ($P=0.000$),表明群体间已存在显著的遗传分化。

表 4 乌鳢 3 个群体线粒体 D-Loop 区序列的遗传多样性参数
Tab.4 Genetic diversity parameters of mtDNA D-Loop sequence in three populations of *C. argu*

群体 population	样本数 sample size	变异位点 variable sites	单倍型 haplotypes(<i>h</i>)	单倍型多样性 haplotype diversity (<i>H_d</i>)	核苷酸多样性 nucleotide diversity (<i>P_i</i>)	平均核苷酸差异数 average number of nucleotide differences(<i>k</i>)
BW	30	6	4	0.579	0.001 43	1.290
PW	31	9	5	0.480	0.002 09	1.892
DW	43	27	20	0.855	0.003 27	2.949
总体 total	104	37	27	0.875	0.003 27	2.939

表 5 乌鳢 3 个地理群体线粒体 DNA D-Loop 区分子变异分析
Tab.5 Analysis of molecular variance(AMOVA) of mtDNA control region in three *C. argu* populations

变异来源 source of variation	自由度 <i>df</i>	方差总和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分比 percentage of variation	<i>F_{st}</i>
群体间 among populations	2	48.081	0.662 33 Va	31.91	0.319 14
种内 within opulations	101	142.717	1.413 04 Vb	68.09	
总计 total	103	190.798	2.075 37		

对 3 个乌鳢地理群体间的 F_{st} 值和基因交流 N_m 结果分析显示,两两群体间均有一定的遗传分化, F_{st} 值差异均显著 ($P=0.000$),表明 3 个群体间存在显著的遗传分化,但未形成具有显著的遗传分化的种群。白洋淀群体和平原县群体的群体间基因流 N_m 值为 1.201 04,大于 1,说明它们之间发生着一定的基因交流,可能存在共同起源;而洞庭湖群体与其他两个群体间的基因流均小于 1 (表 6)。

表 6 乌鳢 3 个地理群体间的 F_{st} 值和基因交流 N_m
Tab.6 The inter-population F_{st} values and genetic flow N_m in *C. argu*

	PW	BW	DW
PW		1.201 04	0.391 55
BW	0.172 29		0.549 23
DW	0.389 68	0.312 80	

采用 NJ 法进行系统发育树的构建,并对分枝进行 1 000 次的重复检验。在 27 个单倍型 NJ 树(图 2),3 个群体所独有的单倍型并未各自聚类形成独立的分支,而是相互交错形成复杂的簇群,说明了乌鳢 3 个群体间的分化并不明显。

3 讨论

3.1 乌鳢控制区结构及组成特点

D-Loop 区是 mtDNA 内最复杂的结构,也是其突变的热点区域,但也包含一些保守片段。乌鳢控制区与脊椎动物的类似,主要分为 3 个部分:终止序列区、中央保守区和保守序列区。终止序列区包含许多重复序列,是线粒体 DNA 长度变异的主要原因^[20]。乌鳢的终止序列区含有 3 个 TACAT 核心序列及 2 个互补序列 ATGTA,二者可形成发夹结构。终止序列区的碱基变异率为 8.96%,明显高于中央保守区的碱基变异率(0.169%),表现为高变异性。中央保守区的 CSB-F、CSB-E、CSB-D 序列具有较高的保守性,与其他鱼类的关键序列相似^[16-17]。保守序列区包含 3 个保守序列 CSB1、CSB2 和 CSB3,有研究显示,CSB1 与线粒体的复制起点相关^[21]。CSB1 在哺乳动物中比较稳定,而在鱼类中变异较大,不易被识别。本研究根据朱世华等^[15]发现的特征序列 GAGCATA 鉴别了乌鳢 CSB1 序列的存在,这种情况也曾用于其他鱼类线粒体 D-Loop 区

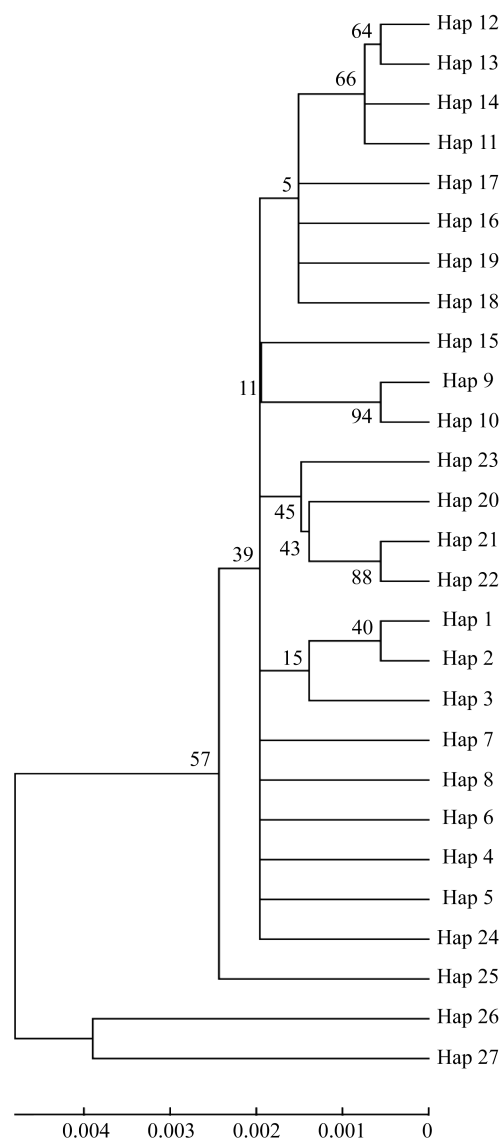


图2 乌鳢3个野生群体单倍型基于线粒体DNA D-Loop区序列构建的NJ树

Fig. 2 NJ tree based on the mtDNA D-Loop sequence in three wild populations of *C. argu*

CSB1的鉴别过程^[18]。已有研究显示,线粒体D-Loop区的保守序列区还有L-链启动子(LSP)及H-链启动子(HSP)和H-链复制起始区(OH)^[22]。

3.2 乌鳢遗传多样性分析

遗传多样性与自然选择产生的适应性及物种的进化潜力密切相关,丰富的遗传多样性可以维持种群的多样性,其表现出来的遗传多样性也越丰富,对环境的适应能力就越强,越容易扩展分布范围和扩展新的生存环境,而遗传多样性的贫乏或缺失会威胁到种群的生存^[23]。本研究测定了

乌鳢共104个个体的mtDNA控制区全序列,104条序列中发现37个变异位点,占分析位点总数的4.07%。变异类型有转换、颠换、插入、缺失及转换和颠换。结果表明,洞庭湖群体>平原县群体>白洋淀群体,3个乌鳢野生群体间和群体内的核苷酸多样性均低于0.005,表现为核苷酸多样性较低的现象。从单倍型多样性来看,洞庭湖群体拥有20个单倍型,表现为较高水平的单倍型多样性(0.855)。种群数量的大小、环境的不均一性及具有适应种群快速增长的特性,是种群内维持较高单倍型多样性的主要原因^[24]。洞庭湖为我国第二大淡水湖,湖水水系发达,使其成为多种鱼类的种质资源库^[25],因此,洞庭湖野生乌鳢群体表现为丰富的遗传多样性,单倍型数量较其他群体多。

遗传距离多用来分析不同群体间的遗传分化程度和群体内的遗传多样性,数值越大,群体内或群体间分化程度越大,数值越小,群体内或群体间分化程度越小。3个野生乌鳢群体所有个体间平均遗传距离为0.003 28,群体间的遗传距离为0.001~0.005,较松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)^[26]群体间的遗传距离(0.005~0.008)和泥鳅(*Migurnus anguillicaudatus*)^[19]群体间的遗传距离(0.011~0.016)波动小,表明乌鳢各群体间的分化程度相对较低。

遗传分化指数 F_{st} 多用于分析不同群体间的遗传差异, F_{st} 为0~0.05,表明群体间分化较小;若 F_{st} 为0.05~0.15,则群体间存在中等程度的分化;而 F_{st} 为0.15~0.25,群体间就表现为较高的分化^[27]。从3个乌鳢野生群体的遗传分化指数来看,两两群体间均达到一定程度的分化,且较显著($P=0.000$),这是由于不同的水系水生生物之间存在明显的地理障碍,通常在流域之间存在明显的种群分化^[28]。基因流是指基因从一个种群到另一个种群的转移、交流,基因流会把一个群体中的基因带给另一个群体,基因流越大,群体间的相似性越大^[29]。白洋淀群体和平原县群体间存在频繁基因交流,它们之间的基因流 N_m 值为1.201 04,大于1,说明它们之间有着共同起源,这可能与两地之间的距离相对较近有一定的关系。洞庭湖群体与其他群体间的基因流值较小,且无共享单倍型,说明洞庭湖群体与其他群体间基因交流较为匮乏,这可能是由于与其他两群体间具

有一定地理隔离以及环境因素不同所致。

遗传多样性的降低可能受多种因素的影响,如自然灾害、人工选择、过度捕捞等。因此,我们应分析不同地区乌鳢群体的遗传多样性,根据其遗传多样性的变化趋势采取相应的措施,科学保护野生乌鳢的种质资源,使其成为可持续利用的渔业资源。

参考文献:

- [1] Lu F, Liu D, Ye X, *et al.* Alginate-calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 °C [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(5): 848 – 854.
- [2] Zhou Y B. Biological characterization and efficient breeding technology of *Channa argus* [J]. *Jiangxi Fishery Sciences and Technology*, 2006(3): 43 – 48. [周义斌. 乌鳢生物学特性及其高效养殖技术. 江西水产科技, 2006(3): 43 – 48].
- [3] Nie G X, Fu Y R, Zhang H, *et al.* Analysis of nutritional ingredient in *Ophiocephalus argus*' s muscle [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, 32(2): 46 – 47. [聂国兴, 傅艳茹, 张浩, 等. 乌鳢肌肉营养成分分析. 淡水渔业, 2002, 32(2): 46 – 47.]
- [4] Zhu L, Xie N, Zhu S R, *et al.* Analysis of culture characteristics of F₁ hybrids from different combinations of *Channa maculate* (♀) × *C. argus* (♂) [J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(6): 81 – 84. [朱林, 谢楠, 朱树人, 等. 斑鳢(♀) × 乌鳢(♂) 不同组合 F₁ 代养殖性能分析. 淡水渔业, 2011, 41(6): 81 – 84.]
- [5] 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.]
- [6] Fischer C, Koblmüller S, Güllý C, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequences of the threadfin cichlid (*Petrochromis trewavasae*) and the blunthead cichlid (*Tropheus moorii*) and patterns of mitochondrial genome evolution in cichlid fishes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67048.
- [7] Bremer J R A, Mejuto J, Greig T W, *et al.* Global population structure of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) as revealed by analysis of the mitochondrial DNA control region [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, 197(2): 295 – 310.
- [8] Huang Z J, Xu X P, Tang J J, *et al.* Application and primer design of mitochondrial DNA D-loop of freshwater fishes [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2009, 48(4): 84 – 88. [黄志坚, 徐晓鹏, 唐晶晶, 等. 淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 基因的引物设计 and 应用. 中山大学学报; 自然科学版, 2009, 48(4): 84 – 88.]
- [9] 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 Res*, 1997, 25(24): 4876 – 4882.
- [10] Koichiro T, Daniel P, Nicholas P, *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.
- [11] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451 – 1452.
- [12] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47 – 50.
- [13] Liu H Z. The structure and evolution of mitochondrial DNA control region of fish: a case study to bitterlings [J]. *Progress in Natural Science*, 2002, 12(3): 266 – 270. [刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构和进化: 以鲢鳊鱼类为例 [J]. 自然科学进展, 2002, 12(3): 266 – 270.]
- [14] Lee W J, Conroy J, Howell W H, *et al.* Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 41(1): 54 – 66.
- [15] Zhu S H, Zheng W J, Zou J X, *et al.* Mitochondrial DNA control region structure and molecular phylogenetic relationship of Carangidae [J]. *Zoological Research*, 2007, 28(6): 606 – 614. [朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 等. 鲮科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系. 动物学研究, 2007, 28(6): 606 – 614.]
- [16] Qin Q, Xu Z Q, Bian W J, *et al.* Structure of mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(4): 50 – 54. [秦钦, 许志强, 边文冀, 等. 斑点叉尾鲷线粒体 DNA 控制区结构和群体遗传多样性分析. 淡

- 水渔业,2011,41(4):50-54.]
- [17] Noack K, Zardoya R, Meyer A. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order [J]. *Genetics*, 1996, 144 (3): 1165-1180.
- [18] Yang B, Chen X Y, Yang J X. Structure of the mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis of *Anabarrilius grahami* (Regan) [J]. *Zoological Research*, 2008, 29 (4): 379-385. [杨博,陈小勇,杨君兴. 鳊白鱼线粒体 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.]
- [19] Rong C Z, Zu G Z, Hu J H, *et al.* Structure of mitochondrial DNA control region and genetic diversity of *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *South China Fisheries Science*, 2011, 7 (5): 55-62. [荣朝振,祖国掌,胡建华,等. 泥鳅线粒体 DNA 控制区结构分析及遗传多样性研究. 南方水产科学,2011,7(5):55-62.]
- [20] Guo X H, Liu S J, Liu Q, *et al.* New progresses on mitochondrial DNA in fish [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31 (9): 983-1000. [郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报,2004,31(9):983-1000.]
- [21] Chang D D, Clayton D A. Identification of primary transcriptional start sites of mouse mitochondrial DNA; accurate in vitro initiation of both heavy-and light-strand transcripts [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1986, 6 (5): 1446-1453.
- [22] Ghivizzani S C, Mackay S L D, Madsen C S, *et al.* Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, 37 (1): 36-37.
- [23] Shen G, Liu D Y. Summary of genetic diversity [J]. *Journal of Biology*, 2001, 18 (3): 5-7. [沈浩,刘登义. 遗传多样性概述. 生物学杂志,2001,18(3):5-7.]
- [24] Nei M. *Molecular evolutionary genetics* [M]. Columbia University Press, 1987
- [25] Lu H J, Liu X Q, Huang X R, *et al.* Diversity of fish species and its spatio-temporal variations in Lake Dongting, a large Yangtze-connected lake [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2008, 20 (1): 93-99. [茹辉军,刘学勤,黄向荣,等. 大型通江湖泊洞庭湖的鱼类物种多样性及其时空变化. 湖泊科学,2008,20(1):93-99.]
- [26] Liu H L, Zhang Q, Tang Y L, *et al.* Structure and genetic diversity of mtDNA D-Loop sequences among *Trachidermus fasciatus* stocks in Yellow Sea and Bohai Sea of China [J]. *Marine Science Bulletin*, 2010, 29 (3): 283-288. [刘海林,章群,唐优良,等. 黄渤海松江鲈鱼线粒体控制区结构与序列多态性分析. 海洋通报,2010,29(3):283-288.]
- [27] Wright S. The genetical structure of populations [J]. *Annals of Eugenics*, 1949, 15 (1): 323-354.
- [28] Zhao L, Zhang J, Liu Z J, *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Neosalanx jordani* based on cytochrome *b* sequences [J]. *Biodiversity Science*, 2010, 18 (3): 251-261. [赵亮,张洁,刘志瑾,等. 乔氏新银鱼基于细胞色素 *b* 序列的种群遗传结构和种群历史. 生物多样性,2010,18(3):251-261.]
- [29] Qu R Z, Hou L, Lv H L, *et al.* The gene flow of population genetic structure [J]. *Hereditas*, 2004, 26 (3): 377-382. [曲若竹,侯林,吕红丽,等. 群体遗传结构中的基因流. 遗传,2004,26(3):377-382.]

Structure analysis of mtDNA D-Loop region and the genetic diversity of *Channa argu* in different populations

DONG Xinpei¹, MU Shumei¹, ZHOU Nan¹, KANG Xianjiang^{1*}, LUO Qing², BAI Junjie²

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071000, China;

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Fishery Academy of Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: PCR and DNA sequencing technology were used to compare the DNA sequence of mitochondrial control region of 3 *Channa argu* populations to study the structure and the genetic diversity. The result shows that the sequence length of the D-Loop region which was used for analysis is 905 – 908 bp. 37 polymorphic sites were found in 104 sequences and 27 haplotypes were defined. Meanwhile, the control region was analyzed, including terminal associated sequence, central conserved domains and conserved sequence block domains. The haploid type diversity (H_d), nucleotide diversity (P_i) and the average number of nucleotide differences (k) of 3 geographical populations were 0.875, 0.003 27 and 2.939 respectively. Average Kimura double parameters of genetic distance between populations, genetic differentiation index (F_{st}), gene exchange value (N_m) and Analysis of Molecular Variance (AMOVA) all indicated that 3 populations of *C. argu* have high genetic differentiation. The Baiyangdian population and Pinyuan County population had certain gene exchange.

Key words: *Channa argu*; mitochondrial D-Loop; genetic diversity

Corresponding author: KANG Xianjiang. E-mail: xjkang@hbu.edu.cn

《水生生物学报》2015 年征订启事

《水生生物学报》是中国科学院水生生物研究所、中国海洋湖沼学会主办的水生生物学领域的综合性学术刊物,是中国科技核心期刊、中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊,现任主编桂建芳院士。本刊创刊于 1955 年,为大 16 开本双月刊,国内外公开发行。主要刊登水生态的评价与治理,水生生物的生化、遗传、病理、毒理和分类区系,水生生物的育种、培养、开发利用和病害防治,渔业生物学及有关湖沼学的综合调查与研究等相关的中、英文研究论文、研究简报及综述。本刊读者对象为大专院校生物系、水产系、养殖系及环境、生态有关专业的师生;从事水产、淡水生物、水生态和环境保护等方面的科研人员和生产技术工作者及有关科技情报工作者。

本刊每期定价:40 元,国内刊号:CN 42-1230/Q,国内邮发代号:82-329,国际刊号:ISSN 1000-3207,国外发行代号:BM 856。国内订购:全国各地邮电局,国外总发行:中国国际图书贸易总公司。

本刊总发行:科学出版社

地址:北京东黄城根北街 16 号(邮编:100717)

电话:010-64017032

电子邮箱:sales_journal@mail.sciencep.com