

贵州两地理群体鲫的系统发育及遗传分化

安苗*, 周其椿, 曹恒源, 郭健康

(贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 分布于贵州省普安县青山镇和威宁县草海的鲫, 系喀斯特山区彼此隔离的2个地理群体, 为探明其遗传结构, 探讨彼此间系统关系及遗传分化情况, 本研究对其mtDNA D-loop区进行测序分析。结果显示: 普安鲫有919和921~927bp 8种序列长度类型, 分属27种基因型和14种单倍型; 草海鲫有923~925bp 3种序列类型, 分属11种基因型和6种单倍型; 序列差异因碱基替换和缺失/插入不同所致。普安鲫是银鲫和鲫指名亚种及其所含3个亚类群的混生群体; 草海鲫为鲫指名亚种2个亚类群的混合群体。普安鲫及其指名亚种群体遗传多样性水平中等, 草海鲫及其指名亚种群体遗传多样性偏低, 普安的银鲫群体遗传多样性水平极低。研究表明, 喀斯特山区2地理群体鲫具有群体组成复杂和母系来源多样的发育特点, 因长期的地理隔离、生殖隔离和基因交流缺乏所造成的遗传漂变和进化速率差异, 其基因型和单倍型呈明显地理分布格局, 各群体间遗传分化严重。普安的银鲫系东北银鲫起源, 遗传变异低, 急需改善亲本质量。草海鲫因奠基者效应、瓶颈效应和遗传漂变导致其遗传多样性偏低。本研究丰富了喀斯特山区鱼类群体遗传学资料, 为地方鲫种质资源鉴定与评价提供基础资料。

关键词: 鲫; 线粒体控制区; 遗传多样性; 系统发育; 遗传分化; 喀斯特山区

中图分类号: Q 346; S 917.4

文献标志码: A

鲫(*Carassius auratus*)具有广泛的地理分布、众多的地方种群以及丰富的遗传变异。贵州地处西部喀斯特山区, 孕育了独特的地方鲫, 如普安县青山镇一带山塘水体中的普安鲫^[1]。罗静等^[2]研究贵州与云南、四川和湖北的鲫间既有相同单倍型也有独有单倍型, 而与银鲫(*Carassius auratus gibelio*)无共享单倍型, 王姝妍^[3]报道普安鲫是鲫指名亚种(*Carassius auratus auratus*)和银鲫的混生群体。比较而言, 威宁县草海国家级自然保护区内鲫的研究比较欠缺, 姚纪花等^[4]对草海鲫与其余5个地理种群研究结果显示, 它与云南滇池鲫之间遗传关系最为密切, 存在mtDNA的多态性, 无显著遗传分化。最近我们研究发现其性比严重失调^[5], 群体中存在二倍体和三倍体^[6]。综上所述, 地理上彼此隔离且具有独特生物学性状的2种鲫群体, 其组成及所属地位尚存

疑问, 彼此间系统发育关系及遗传分化仍不甚清楚。

mtDNA呈母系遗传和快速进化特点, 能有效分辨较近的进化事件, 是群体遗传学和分子系统学研究的重要标记。其中控制区进化速度最快, 遗传变异大, 能够有效地检测种群分化, 甚至能发现亚种的存在, 非常适合种内遗传分化和遗传关系研究^[7-9]。本研究拟对2地理群体mtDNA D-loop区测序与分析, 系统地比较其遗传结构, 了解彼此间的系统发育关系与遗传分化, 为地方鱼类种质资源保护与利用提供理论指导。

1 材料与amp;方法

1.1 样品来源

样品鲫采自贵州省普安县青山镇普安鲫原种

收稿日期: 2015-07-10 修回日期: 2015-11-11

资助项目: 贵州省自然科学基金[(2011)2223]

通信作者: 安苗, E-mail: gzuam@163.com

场及附近的山塘(群体记为GP)和贵州省威宁县草海国家级自然保护区3个站点^[6](群体记为GC),普安县和威宁县地处我省西部和西北部典型的喀斯特山区。红鲫(*C. auratus* red var.)采自贵州大学教学实验农场,作为对照(群体记为DH)。从渔获物中随机挑选健康的个体,活鱼运回校养殖室暂养,解剖取背部肌肉于100%乙醇中,-20 °C保存备用。51尾普安鲫的体质量为(119.43±67.27)g,体长为(15.79±2.88)cm;26尾草海鲫的体质量为(78.90±7.43)g,体长为(13.80±0.31)cm;10尾红鲫的体质量为(46.60±4.27)g,体长为(9.87±0.17)cm。

1.2 实验方法

全基因组DNA的提取 用天根生化科技(北京)有限公司的血样/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒提取肌肉样品中DNA,WFZ-UV-2100型紫外分光光度计测定DNA样品纯度和浓度,所获DNA原液于-20 °C保存备用。

PCR扩增与序列测定 根据萍乡红鲫(NC015142)的mtDNA D-loop区基因序列,使用Primer Premier 5.0设计引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。上游序列为:5'-TCGCACTGTTCTTGTTTC-3',下游引物为:5'-TAGGCGTCTTGGGCTAAT-3',扩增片段长度约1336 bp。

PCR反应总体积为20μL,包括2×Taq PCR MasterMix试剂(含0.1U Taq Polymerase/μL,500μM dNTP each,20mM Tris-HCl,100mM KCl,3mM MgCl₂)10μL,模板DNA 2μL,上、下游引物各1μL,ddH₂O 6μL。所需试剂均购自天根生化科技(北京)有限公司。94 °C预变性5min;94 °C变性30 s,58 °C退火60 s,72 °C延伸90 s,共35个循环;最后72 °C充分延伸10 min,4 °C保存。整个反应在AB公司(美国)的PTC-200PCR扩增仪上完成。经1.5%琼脂糖凝胶电泳,置凝胶于

BioSens SC 710紫外凝胶成像系统中观测,以DL2,000 DNA Marker作参照,判断PCR产物及PCR产物是否为目的片段。产物经回收和纯化后送北京诺赛基因组研究中心有限公司双向测序。

1.3 数据处理及分析

用Clustalx 2.0软件对所测得的正、反向序列进行拼接,手动检查确定每个位点准确性。以淇河鲫(EF633637) D-loop区序列做参考,将所有一致性序列用BioEdit软件编辑成Mega软件能识别的格式。利用DAMBE version:5.5.17划分基因型,序列提交GenBank,登记号GI:1805330,序列号:KP899460- KP899498。用DNASP4.50.3计算单倍型数、序列变异位点、遗传多样性和遗传分化参数,基因流由 $Nm \approx (1-F_{st}) / (4F_{st})$ 计算。采用MEGA 6.06计算碱基的组成、替换、缺失/插入和遗传距离,采用邻接法,基于Kimura双参数模型构建分子树。

2 结果与分析

2.1 喀斯特山区2个地理群体鲫mtDNA D-Loop区序列差异

D-Loop序列长度、碱基组成及变异 普安鲫mtDNA D-Loop序列长度有919和921~927bp 8种类型,草海鲫序列长度有923~925bp 3种类型,对照红鲫的序列长度为923和924 bp(表1)。2个地理群体碱基含量差别不大,呈明显的AT含量(65.3%、65.2%)高和GC含量(34.7%、34.8%)低的偏向性特点。其AT含量略高于对照红鲫(64.8%),而GC含量略低于红鲫(35.2%)。普安鲫有转换位点43个,颠换位点15个,缺失/插入位点25个。草海鲫有转换位点25个,颠换位点3个,缺失/插入位点16个。红鲫有转换位点

表1 鲫3个群体mtDNA D-Loop区核苷酸组成

Tab. 1 Nucleotide composition of mtDNA D-loop of three populations of *C. auratus*

群体 population	T(U)	C	A	G	序列长度(bp)对应个体数/尾 individual number for different sequence length							
					919	921	922	923	924	925	926	927
GP	32.9	20.4	32.4	14.3	3	1	8	12	19	6	1	1
GC	32.7	20.6	32.5	14.2				19	6	1		
DH	32.7	20.7	32.1	14.5				8	2			

7个, 颠换位点1个, 缺失/插入位点16个。转换数都大于颠换数, 碱基替换未达到饱和。

D-Loop区的基因型 87尾个体共产生39种基因型(genotype, Gep1-39)序列, 其中普安鲫有

27种, Gep16、Gep32和Gep36与红鲫共享; 草海鲫有11种, Gep38与红鲫共享, 剩下1种基因型(Gep7)为对照红鲫独有(表2)。2地理群体无相同的基因型。

表2 鲫3个群体单倍型分布

Tab. 2 Distribution of haplotypes in three populations of *C. auratus*

单倍型haplotype	基因型 genotype	群体population			单倍型对应个体总数/尾 haplotype of total individual number
		GP	GC	DH	
Hap1	Gep1, Gep 2, Gep6, Gep11, Gep25, Gep35	24			24
Hap2	Gep3, Gep 4, Gep14		12		12
Hap3	Gep7, Gep16, Gep24, Gep26, Gep32	9		7	16
Hap4	Gep8, Gep15, Gep39		9		9
Hap5	Gep5		1		1
Hap6	Gep10, Gep21, Gep31	4			4
Hap7	Gep38		1	2	3
Hap8	Gep9	1			1
Hap9	Gep12, Gep 13		2		2
Hap10	Gep17, Gep29, Gep 30	3			3
Hap11	Gep18, Gep33	2			2
Hap12	Gep19	1			1
Hap13	Gep20	1			1
Hap14	Gep22	1			1
Hap15	Gep23	1			1
Hap16	Gep27	1			1
Hap17	Gep28	1			1
Hap18	Gep34	1			1
Hap19	Gep36	1		1	2
Hap20	Gep37		1		1
总计total		14	6	3	

Blast结果显示, 普安鲫的Gep25和Gep35与黑龙江的银鲫(GU138989)、方正银鲫(AB377293)和银鲫A系(AY786068)等同源性达100%; Gep10和Gep21与方正银鲫(EF633622)同源性达100%。草海鲫的Gep5、Gep13和Gep38分别与淇河鲫(EF633640)、方正银鲫(EF633620)和金鱼*C. auratus auratus* (JF694781)以及红鲫(GQ303444)的同源性达100%。其余31种基因型与鲫属*Carassius*鱼类同源性高达97%~99%, 说明测定

的序列为控制区。

mtDNA D-loop单倍型分布 87尾个体共产生20种单倍型, 其中普安鲫共产生14种单倍型, Hap3和Hap19与红鲫共享, 另12个单倍型为其独有; 草海鲫有6种单倍型, 除Hap7与红鲫共享外, 其余5个单倍型也为其独有; 对照红鲫有3个单倍型, 分别与普安鲫和草海鲫共享(表2)。普安和草海2个鲫群体无共享的单倍型, 呈明显的地理分布格局。

2.2 喀斯特山区2个地理群体鲫的系统发育关系及其起源

单倍型间遗传距离及其系统关系 2群体的单倍型间遗传距离(0.015)略高于草海鲫(0.011)而低于普安鲫(0.018)。依遗传距离大于0.01, 其群体遗传变异较大的观点^[10], 本研究的2地理鲫群体内和群体间都存在较高的变异。其中普安鲫的单倍型间遗传距离的变动幅度最大(0.001~0.040), 平均值最高(0.018±0.004), 遗传变异最大, 而草海鲫遗传差异最小(0.001~0.024, 0.011±0.003)。

普安鲫的Hap1和Hap6与群体内其余单倍型的遗传距离(0.022~0.039, 0.029±0.005;

0.024~0.040, 0.031±0.005)达亚种间遗传距离0.02~0.2的范围值^[11], 分歧较大, 亲缘关系也较远。草海鲫的Hap5也有类似情况(0.020~0.024, 0.022±0.002)。

从GenBank中下载鲫属18个单倍型鱼D-Loop区全序列(图1), 与本研究中20个单倍型一起, 进行同源一致性比对后(长度929位点), 以鲤(*Cyprinus carpio*)(NC018037)为外群, 构建NJ分子系统发育树。结果显示, 外群鲤和鲫属(*Carassius*)单独成一枝; 鲫属中黑鲫(*C. carassius*)和鲫为独立2枝, 与传统分类一致。本研究中普安鲫是一个含银鲫的混生群体, 与王姝妍^[3]的结果相似; 草海鲫是一个含类似淇河鲫的单倍型鱼(EF633640)的混合群体; Hap1和

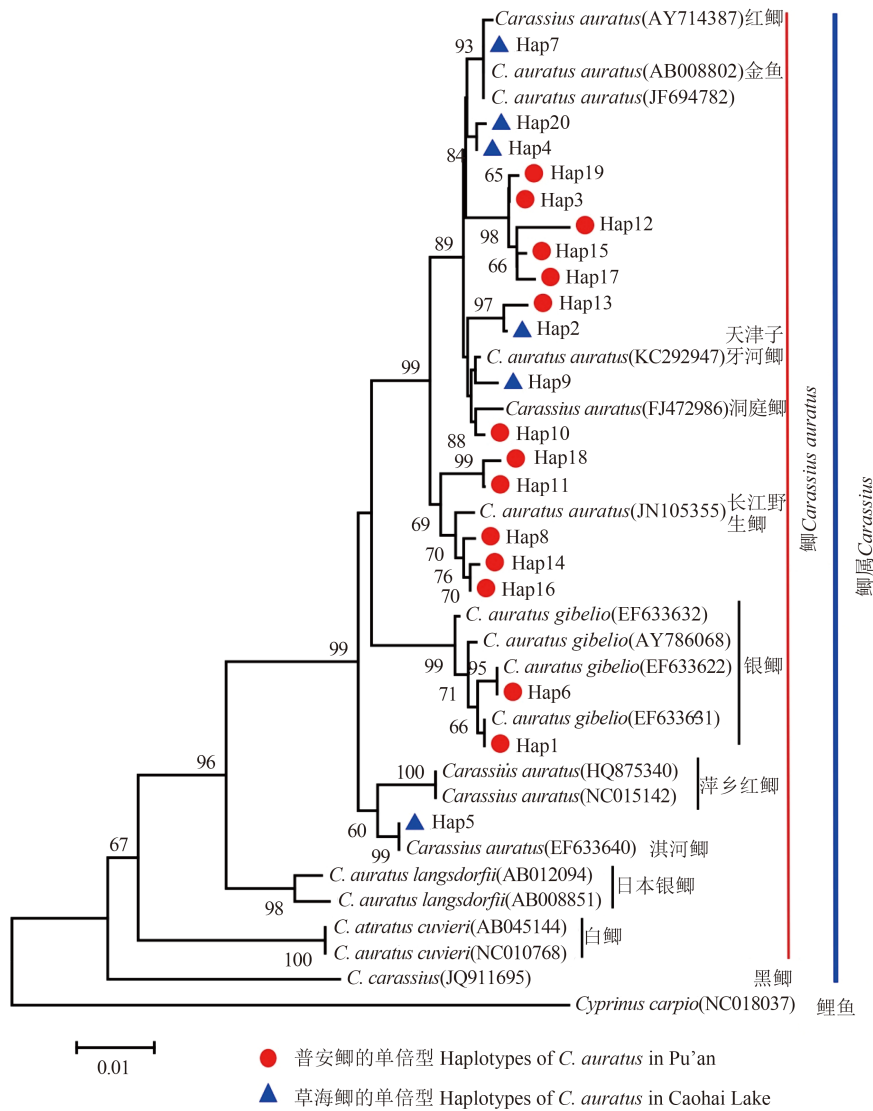


图 1 三十九个单倍型D-Loop区序列构建的NJ系统发育树(1000 Bootstrap)

Fig. 1 Phylogenetic tree of thirty-nine haplotypes based D-Loop sequences by NJ method(1000 Bootstrap)

Hap6为银鲫, Hap5类似于行天然雌核发育的淇河鲫; 2群体除Hap2和Hap13亲缘关系最近外, 其余单倍型间关系较远(图1)。系统关系显示2群体组成的多样性和地理隔离的独立性。

起源与进化 借鉴王姝妍^[3]和Takada等^[12]的研究结果, 从GenBank下载鲫属47个单倍型鱼序列与本研究20个单倍型序列经比对后(长度319位点), 构建NJ分子进化树(图2)。鲫属67个单倍型鱼明显分为2枝, 日本银鲫和我国鲫占据其中1枝, 我国鲫分为6个亚类群(Sublineage I~Sublineage VI)(图2), 其聚类情况与王姝妍^[3]的研究结果大致相似。本研究的20个单倍型中, 普安鲫的Hap1和Hap6属银鲫聚在亚类群II内, 与黑龙江水系银鲫同源; Hap8、Hap11、Hap14、Hap16和Hap18一起聚在亚类群V内, 属长江中下游的鲫起源; 剩余7个单倍型在亚类群VI中为彼此独立3个枝系, 其中Hap12、Hap15、Hap17、Hap3和Hap19 5个单倍型单独聚集一起, 结合Hap3和Hap19同红鲫共享, 推测它们与红鲫同源, Hap13与普安鲫的单倍型DQ984982和草海鲫Hap2聚类, Hap10与普安鲫的单倍型DQ984952聚集, 它们相互独立并与其他地理群体关系较远。因此普安鲫是银鲫、鲫指名亚种的亚类群V和亚类群VI共同组成, 由多个母系起源的混生群体, 与王姝妍^[3]群体组成的结论略有不同(多出亚类群V)。草海鲫是鲫指名亚种的亚类群IV和VI组成的混合群体; Hap5与萍乡红鲫HQ875340和淇河鲫EF633640一起聚在亚类群IV中, 起源于我国东南部鲫; 另5个单倍型聚集在亚类群VI中, 同红鲫共享的Hap7与金鱼和红鲫一起来源于南方野生鲫, 剩余4个单倍型从亚类群VI内分离后在喀斯特山区有着独立进化特点。草海鲫Hap7与普安鲫5个单倍型虽属红鲫起源, 但在亚类群VI内分属不同谱系, 应为不同母系来源。2地理群体除Hap13和Hap2关系近有同一起源外, 其余单倍型无同一母系来源。

2.3 喀斯特山区2个地理群体鲫的遗传多样性和遗传分化

遗传多样性 从S、H、Hd、Pi和K 5个遗传多样性参数比较来看, 普安鲫(GP)都比草海鲫(GC)要高得多(表3), 其群体遗传变异程度最大, 遗传多样性最高。3个亚种间普安鲫指明亚种(PCA)群体的多样性程度最高, 普安的银鲫(PCG)的多样性最低。

遗传分化 D、Fst和Gst 3个遗传分化参数显示, 2地理群体间及其亚种种群间都存在显著遗传分化(表4)。遗传分化由群体内遗传变异造成, 而且它们的Nm值都小于1, 说明地理隔离或生殖隔离等遗传漂变已阻碍了群体间基因交流, 遗传分化严重。以鱼类mtDNA碱基突变率每百万年2%估算^[13-14], 3个亚种间分歧时间以PCG与PCA和CCA间的1.45 Ma最大, PCG和CCA间0.50 Ma最小。另外PCA与DH无分化, 存在较强的基因交流。

3 讨论

3.1 喀斯特山区2个地理群体鲫的起源与进化

普安鲫系统地位及起源之前已有报道^[1,15-16], 结合本研究结果有几点值得商榷: ①起源, 普安的银鲫与黑龙江的银鲫及其品系有很高同源性(99%~100%), 依据我国银鲫自然分布于黑龙江水系和额尔齐斯河水系^[17], 出现在南方水体中的银鲫已证实系北方起源^[3,18-23], 再结合其雌核生殖和mtDNA母性遗传特点, 可推断普安的银鲫也为北方银鲫起源, 迁入可能性极大。另23尾鲫指名亚种与我国鲫亚类群V和VI同源, 但长期的隔离已显示其喀斯特山区本土进化特点, 与其他水域鲫关系变得疏远。②3个亚类群(II、V和VI)的侧线鳞范围不同于之前的A、B和C类型鱼^[1], 28尾银鲫的侧线鳞为29~31(30.29±0.71), 亚类群V的6尾鱼侧线鳞为28~30(29.00±0.63), 亚类群VI的17尾鱼侧线鳞为26~30(28.41±1.00)。银鲫和亚类群V鱼侧线鳞涵盖有A型和B型鱼, 亚类群V涵盖有A、B和C型鱼。侧线鳞31的鱼只出现在银鲫中, 侧线鳞26和27的鱼只出现在亚类群V中。③倍性, 俞浩祥等^[11]报道其染色体2n=156, 而Luo等^[2]指出其群体中既有四倍体(2n=100)也有六倍体(2n=150)。一些地方鲫多种倍体混居较为常见^[2,6,22-25], 程磊等人认为鲫指名亚种和银鲫中同时有二倍体和三倍体^[24], 肖俊^[25]认为鲫染色体多倍化是远缘杂交所致, 普安鲫可能也有类似情况。④命名, 普安鲫称*C. auratus*更恰当, 其中的银鲫亚种宜用*C. auratus gibelio*, 指名亚种以*C. auratus auratus*命名。

草海鲫虽然存在性比失衡以及染色体高倍的现象^[5-7], 但本研究证实其并非银鲫, 而是鲫指名亚种2个亚类群的混合群体, 学名适合用*C.*

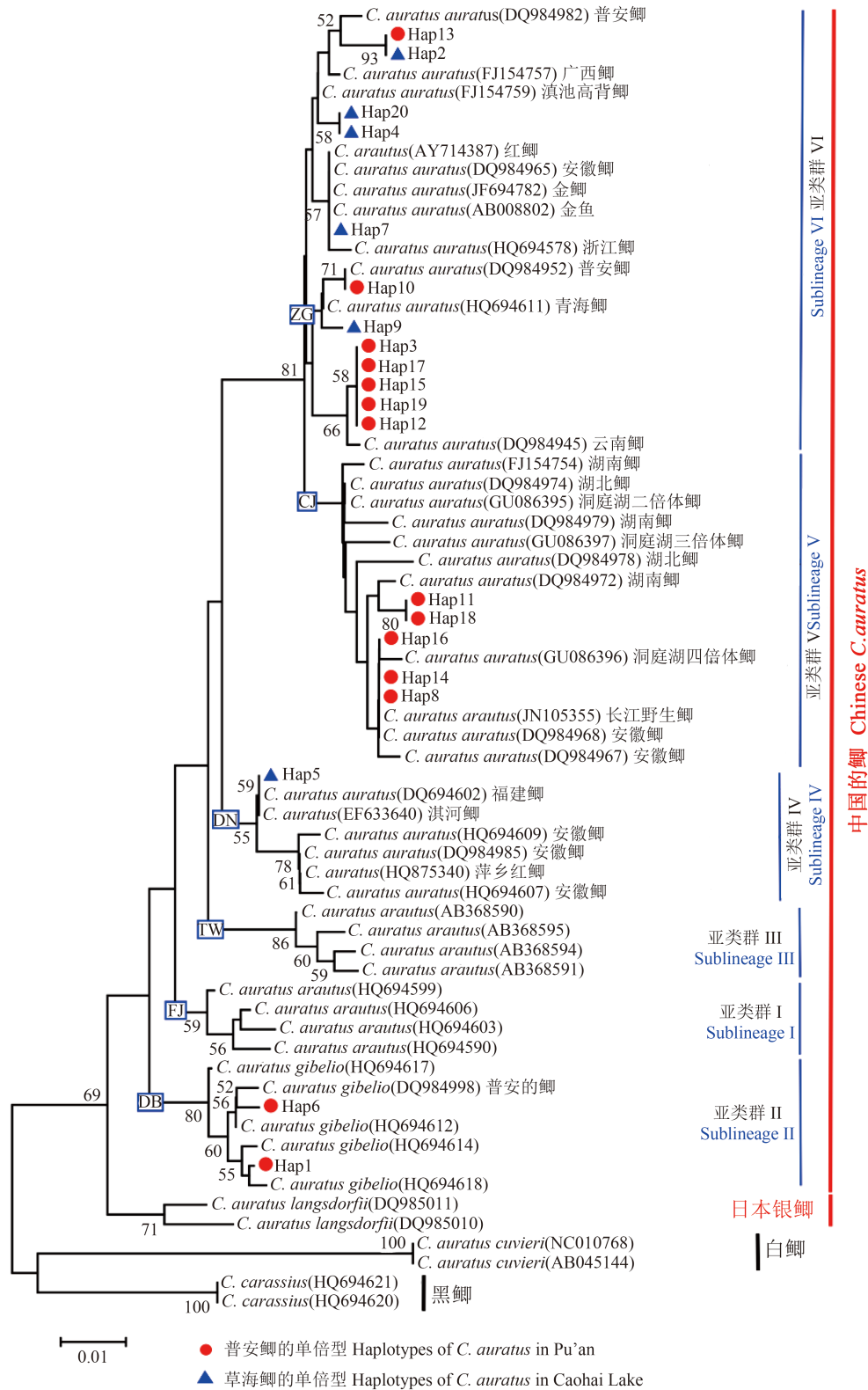


图 2 鲫属67个单倍型D-Loop区序列构建的NJ分子进化树(1000 Bootstrap)

ZG.中国大陆广布的鲫; CJ.长江中下游鲫; DN.东南部鲫; TW.台湾鲫; FJ.福建鲫; DB.东北银鲫

Fig. 2 Molecular evolutionary tree of sixty-seven haplotypes of *Carassius* based D-Loop sequences by NJ method (1000 Bootstrap)

ZG. the wide distribution of crucian carp in mainland China; CJ. crucian carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River; DN. crucian carp in southeast China; TW. crucian carp in Taiwan; FJ. crucian carp in Fujiang; DB. silver crucian carp in northeast China

表 3 2个地理群体鲫的遗传多样性

Tab. 3 Gentic diversity of two *C. auratus* geographical populations

群体population	样本数sample size	H	S	H_d	P_i	K
GP	51	14	55	0.747	0.017	15.04
GC	26	6	28	0.683	0.006	5.18
PCG	28	2	3	0.254	0.001	0.76
PCA	23	12	52	0.842	0.011	9.88
CCA	25	5	13	0.657	0.004	3.95

注: PCG. 普安的银鲫; PCA. 普安的鲫指名亚种; CCA. 草海的鲫指名亚种(25尾, 未包括Hap5); H. 单倍型数; S. 多态性位点; H_d . 单倍型多样性指数; P_i . 核苷酸多样性指数; K. 平均核苷酸差异数; 下同

Notes: PCG. *C. auratus gibelio* in Puan; PCA. *C. auratus auratus* in Puan; CCA. *C. auratus auratus* in Caohai Lake; H. number of haplotypes; S. polymorphic sites; H_d . haplotype diversity; P_i . nucleotide diversity; K. average number of nucleotide differences; the same as below

表 4 2个地理群体鲫的遗传分化

Tab. 4 Gentic differentiation of two *C. auratus* geographical populations

种群1population 1	种群2population 2	D	Fst	Gst	Nm	T/Ma
GP	GC	0.020±0.003	0.441*	0.150	0.317	1.00
PCG	PCA	0.029±0.006	0.818*	0.301	0.056	1.45
PCG	CCA	0.029±0.005	0.907*	0.380	0.026	1.45
PCA	CCA	0.010±0.002	0.313*	0.144	0.549	0.50
PCA	DH	0.007±0.002	0.099 ^{n.s.}	0.030	2.276	0.35

注: D. 群体间遗传距离; Fst. 遗传分化指数; Gst. 基因分化系数; Nm. 基因流; T/Ma. 分歧时间/百万年; * 差异极显著($P < 0.001$); n.s. 无显著性差异($P > 0.05$)

Notes: D. genetic distance; Fst. F-statistics; Gst. genetic differentiation coefficient; Nm. gene flow; T/Ma. multidivtime/million annum; *. means extremely significant difference ($P < 0.001$); n.s. means no significant difference ($P > 0.05$)

auratus auratus。亚类群Ⅳ中的Hap5鱼与淇河鲫(EF633640)同源性达100%, 结合草海在上世纪50年代末和90年代末有过人工养鱼历史^[30], 推测为侵入对象。亚类群Ⅵ中的Hap7与金鱼同源, 其余4个单倍型从亚类群Ⅵ中分离后, 在草海封闭水体中有长期独自进化的历程。

3.2 喀斯特山区2地理群体鲫的遗传多样性

遗传多样性对于一个物种的延续与进化具有重要的意义。 H_d 和 P_i 是评价mtDNA多态性的2个重要指标。如果把王妹妍^[5]关于南方11个省市鲫 P_i 按大小划分为遗传多样性低($P_i = 0.0039 \sim 0.0088$)、遗传多样性水平中等($P_i = 0.0101 \sim 0.0174$)、遗传多样性较高($P_i = 0.0200 \sim 0.0254$)和遗传多样性高($P_i = 0.0385 \sim 0.0854$)4个档次, 则本研究的普安鲫及其指名亚种遗传多样性处于中等水平, 而银鲫遗传多样性水平极低, 草海鲫及其指名亚种的遗传多样性水平偏低。虽然草海鲫及其指名

亚种有较高单倍型多样性($H_d > 0.5$), 但较低的 P_i 值提示尚未能积累核苷酸多样性。

普安鲫分布于青山镇一带的山塘以及与暗河相通天然水体。地处南盘江支流-马别河集雨区, 呈典型喀斯特丘陵山地地貌, 环境气候恶劣, 普安鲫相比其他群体有较高遗传多样性表明其适应能力强, 进化潜力大。普安的银鲫表现出单倍型多态性贫乏、个体间序列同质化和群体遗传多样性偏低的特点, 预示其亲体数量少, 繁育中瓶颈效应和遗传漂变等因素致使其遗传变异度不高, 遗传多样性水平明显下降。因此有必要增加遗传多样性高的亲体数量来改善种质质量。

草海国家级自然保护区, 属长江流域的横江水系, 是相对较小的喀斯特封闭岩溶湖泊, 在此栖息草海鲫分布范围较窄, 资源有限, 有利于个体间频繁近交和基因交流, 易发生基因丢失和遗传改变。另外其环境和资源破坏严重^[5,28]。因此奠基者效应、瓶颈效应和遗传漂变导致群

体变异较小, 遗传多样性偏低就不足为奇。

3.3 喀斯特山区2个地理群体鲫的遗传分化

*Fst*是衡量群体间遗传分化程度的重要指标。参照*Fst*值超过0.25时表示遗传分化极大的解释^[31], 本研究中2个地理群体鲫间及其3个亚种群体之间都存在高度遗传分化, 其中普安的银鲫与2地理鲫指名亚种间分化程度最高, 2群体间居中, 2地理鲫指名亚种间最低。普安的银鲫与鲫指名亚种间分化大, 还体现其较大遗传距离、较长分歧时间(1.45Ma)和极低基因流, 这符合银鲫的亚种分类地位及其雌核生殖方式, 即使与鲫指名亚种混生, 因生殖隔离相互间也较难有基因交流。2地理鲫指名亚种间遗传距离差异未到亚种分化水平, 分类地位相同, 但它们有母系来源、序列变异、单倍型分布、群体组成和遗传多样性水平等方面差异, 其分歧时间约为0.50 Ma, 发生在第四纪更新世, 与苗岭山脉成为长江与珠江两大流域诸水系分水岭和草海湖形成的地质年代相符^[32]。说明长期地理隔离、基因交流缺乏所造成的遗传漂变和进化速率上的差异是其分化严重的主因。

参考文献:

- [1] 俞豪祥, 徐皓, 关宏伟, 等. 天然雌核发育普安鲫的生物学特性的研究[J]. 水生生物学报, 1998, 22(增刊): 16-25.
Yue H X, Xu H, Guan H W, *et al.* A study of biological characters of the natural gynogenetic Puan crucian carp of Guizhou province[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22(suppl.): 16-25 (in Chinese).
- [2] Luo J, Zhang Y P, Zhu C L, *et al.* Genetic diversity in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Biochemical Genetics, 1999, 37(9-10): 267-279.
- [3] 王姝妍. 古环境变化和人工选择对鲫属鱼类遗传结构的影响[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2013: 1-99.
Wang S Y. The impacts of paleoenvironmental changes and anthropogenic selection on the genetic structure of *Carassius*[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2013: 1-99 (in Chinese).
- [4] 姚纪花, 楼允东, 江涌. 我国六个地区银鲫种群线粒体DNA多态性的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 289-295.
Yao J H, Lou Y D, Jiang Y. A study on mitochondrial and polymorphis among six geographical populations of *Carassius auratus gibelio* in China[J]. Journal of Fisheries of China, 1998, 22(4): 288-295 (in Chinese).
- [5] 王金娜, 周其椿, 安苗, 等. 草海鲫鱼繁殖生物学特性的研究[J]. 水产科学, 2013, 32(12): 701-705.
Wang J N, Zhou Q C, An M, *et al.* Reproductive biology of crucian carp *Carassius auratus* in Caohai Lake[J]. Fisheries Science, 2013, 32(12): 701-705 (in Chinese).
- [6] 安苗, 周棋春, 王金娜, 等. 草海鲫DNA含量与倍性[J]. 淡水渔业, 2013, 43(4): 3-7.
An M, Zhou Q C, Wang J N, *et al.* DNA contents and ploidy of crucian carp in Caohai Lake[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(4): 3-7 (in Chinese).
- [7] Ravaoarimanana I B, Tiedemann R, Montagnon D, *et al.* Molecular and cytogenetic evidence for cryptic speciation within a rare endemic Malagasy lemur, the Northern Sportive Lemur (*Lepilemur septentrionalis*)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 31(2): 440-448.
- [8] Falk T M, Teugels G G, Abban E K, *et al.* Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: Support for the refuge zone theory[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 27(1): 81-92.
- [9] 谢振宇, 杜继曾, 陈学群, 等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. 遗传, 2006, 28(3): 362-368.
Xie Z Y, Du J Z, Chen X Q, *et al.* The significance of mitochondria control region (D-Loop) in intraspecific genetic differentiation of fish[J]. Hereditas, 2006, 28(3): 362-368 (in Chinese).
- [10] Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in south west China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism[J]. Biochemical Genetics, 1993, 31(1-2): 51-60.
- [11] 根井正利. 分子群体遗传学与进化论[M]. 王家玉. 北京: 农业出版社, 1983: 121-167.
Nei M. Molecular population genetics and evolution[M]. Wang J Y. Beijing: Agricultural Press, 1983: 121-167 (in Chinese).
- [12] Takada M, Tachihara K, Kon T, *et al.* Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia[J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10(1): 7.
- [13] Wilson G M, Thomas W K, Beckenbach A T. Intra-and

- inter-specific mitochondrial DNA sequence divergence in *salmo*: Rainbow, steelhead, and cutthroat trout[J]. Canadian Journal of Zoology, 1985, 63(9): 2088-2094.
- [14] Thomas W K, Beckenbach A T. Variation in salmonid mitochondrial DNA: Evolutionary constraints and mechanisms of substitution[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1989, 29(3): 233-245.
- [15] 桂建芳. 银鲫生殖方式的特殊性及其遗传基础[M]//桂建芳. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制. 北京: 科学出版社, 2007: 107-124.
- Gui J F. Partiality and genetic basis of reproduction mode of *gibel* carp[M]//Gui J F. Genetic basis and artificial control of sexuality and reproduction in fish. Beijing: Science Press, 2007: 107-124 (in Chinese).
- [16] 周其椿, 林艳红, 彭江涛, 等. 普安银鲫mtDNA D-loop序列多态性分析[J]. 广东农业科学, 2012, 39(22): 173-175.
- Zhou Q C, Lin Y H, Peng J T, *et al.* Polymorphism of D-loop sequence from mtDNA of *Carassius auratus gibelio* Bloch in Puan[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(22): 173-175 (in Chinese).
- [17] 罗云林, 乐佩琦. 鲤亚科[M]//乐佩琦. 中国动物志(硬骨鱼纲·鲤形目·下卷). 北京: 科学技术出版社, 2000: 427-434.
- Luo Y L, Yue P Q. Cyprininae[M]//Yue P Q. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes III. Beijing: Science Press, 2000: 427-434 (in Chinese).
- [18] 张辉, 董新红, 叶玉珍, 等. 三个三倍体鲫鱼品系及野鲫mtDNA的比较研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(4): 330-336.
- Zhang H, Dong X H, Ye Y Z, *et al.* Comparative studies of the mtDNA from three strains of triploid *Carassius auratus* and *C. auratus auratus*[J]. Acta Genetica Sinica, 1998, 25(4): 330-336 (in Chinese).
- [19] 李名友, 周莉, 杨林, 等. 彭泽鲫的分子遗传分析及其与方正银鲫A系的比较[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 472-476.
- Li M Y, Zhou L, Yang L, *et al.* Molecular genetic analysis on Pengze crucian carp and comparison with strain A of gynogenetic silver crucian carp[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(5): 472-476 (in Chinese).
- [20] 刘良国, 杨品红, 王文彬, 等. 洞庭青鲫与其他六个鲫鱼品系线粒体DNA控制区的比较分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 378-387.
- Liu L G, Yang P H, Wang W B, *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial and control region in Dongtingking crucian carp and other six strains of *Carassius auratus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(2): 378-387 (in Chinese).
- [21] 马波, 霍堂斌, 李喆, 等. 额尔齐斯河2种类型雌性银鲫的形态特征及D-loop基因序列比较[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 157-165.
- Ma B, Huo T B, Li Z, *et al.* Comparative analysis between two types of female silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* in the Irtysh River using morphology and mitochondrial control regions[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 157-165 (in Chinese).
- [22] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers[J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 88(1-2): 133-139.
- [23] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Molecular analysis of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) clones by SCAR markers[J]. Aquaculture, 2001, 201(3-4): 219-228.
- [24] 程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲫属鱼类DNA条码及种与亚种划分[J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 463-472.
- Cheng L, Chang Y M, Lu C Y, *et al.* DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*[J]. Zoological Research, 2012, 33(5): 463-472 (in Chinese).
- [25] 肖俊. 洞庭湖水域不同倍性野生鲫鱼生物学特性及进化关系研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2010: 1-116.
- Xiao J. Investigation on biological characteristics of the different ploidy crucian carps (*Carassius auratus* L.) in the Dongting water system and their evolutionary relationship[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2010: 1-116 (in Chinese).
- [26] 咎瑞光. 滇池两种类型鲫鱼的性染色体和C-带核型研究[J]. 遗传学报, 1982, 9(1): 32-39.
- Zan R G. Studies of sex chromosomes and C-banding karyotypes of two forms of *Carassius auratus* in Kunming Lake[J]. Acta Genetica Sinica, 1982, 9(1): 32-39 (in Chinese).
- [27] 周莉, 桂建芳. 银鲫两个雌核发育克隆间两性生殖子代的遗传多样性分析[J]. 实验生物学报, 2001, 34(3):

- 169-176.
- Zhou L, Gui J F. Studies on genetic diversity in gonochoristic offspring produced from mating between two different gynogenetic clones of silver crucian carp[J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2001, 34(3): 169-176 (in Chinese).
- [28] 刘家庄. 贵州最大的构造岩溶湖-草海[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*1987(2): 1-7.
- Liu J Z. The Caohi is greastest Karst Lake by structure in Guizhou[J]. *Journal of Guizhou Normal University(Natural Sciences)*1987(2): 1-7 (in Chinese).
- [29] Nei M. *Molecular evolutionary genetics*[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [30] 周慧, 李迪强, 张于光, 等. 藏羚羊mtDNA D-loop区遗传多样性研究[J]. *遗传*, 2006, 28(3): 299-305.
- Zhou H, Li D Q, Zhang Y G, *et al.* Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan Antelope[J]. *Hereditas*, 2006, 28(3): 299-305 (in Chinese).
- [31] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 155-165.
- [32] 刘福昌. 贵州境内的水系类型[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*1987(2): 8-13.
- Liu F C. The types of river system in Guizhou[J]. *Journal of Guizhou Normal University(Natural Sciences)*1987(2): 8-13 (in Chinese).

Phylogenetic relationship and genetic differentiation of two geographical populations of *Carassius auratus* in Guizhou Province

AN Miao, ZHOU Qichun, CAO Hengyuan, GUO Jiankang
(College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Carassius auratus* in Pu'an and Caohai Lake are the special isolated groups of *C. auratus* in the Karst Mountain Areas. In order to fully understand the genetic structure systematically and discuss the phylogenetic relationship and genetic differentiation of the two populations, the mitochondrial DNA control regions of two geographical populations were analyzed by sequencing technology in this study. The results showed that *C. auratus* in Pu'an had eight types of sequence length of 919 and 921-927 bp, belonging to 27 kinds of genotypes and 14 kinds of haplotypes; *C. auratus* in Caohai Lake had three sequence types of sequence length of 923-925 bp, belonging to 11 kinds of genotypes and 6 kinds of haplotypes; The sequences variation due to base substitution and the deletion/insertion. Clustering analysis confirmed that *C. auratus* in Pu'an were the mixed groups of *C. auratus gibelio* and *C. auratus* including their 3 sublineages. *C. auratus* in Caohai Lake was the mixed groups of 2 sublineages of *C. auratus*. The populations of *C. auratus* and *C. auratus* in Pu'an had medium genetic diversity and the populations of *C. auratus* and *C. auratus* in Caohai Lake had low genetic diversity, while the population of *C. auratus gibelio* in Pu'an had extremely low genetic diversity. The study indicated that the two geographical groups of *C. auratus* had a characteristic of complicated group composition and matrilineal diversity. As the long-term geographical isolation, reproductive isolation and lack of gene flow resulted in the difference of genetic drift and evolutionary rate, which made the genotype and haplotype of D-loop also had obvious geographical distribution pattern, the genetic differentiation was remarkable among various groups. *C. auratus gibelio* in Pu'an and in northeast of China belong to the same origin of matrilineal line, the degree of population genetic variation was so low that improving the quality of the parents was urgent. The founder effect, the bottleneck effect and genetic drift led to the low genetic diversity current situation of *C. auratus* in Caohai Lake. This experiment might enrich the fish population genetics research materials in the Karst Mountain and provide basic data for identification and evaluation of the germplasm resources of the local *C. auratus*.

Key words: *Carassius auratus*; mitochondrial control region; genetic diversity; phylogeny relationship; genetic differentiation; Karst Mountain

Corresponding author: AN Miao. E-mail:gzuan@163.com

Funding projects: Natural Science and Technology Foundation of Guizhou Province, China ([2011] 2223)