



基于线粒体 *COII* 和 *ND4* 基因序列的塔里木裂腹鱼群体遗传多样性分析

任永丽, 代金彩, 赵年桦, 赵贺, 魏杰, 聂竹兰*

(塔里木大学动物科学与技术学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要: 为探究塔里木裂腹鱼群体遗传多样性和遗传分化现状, 实验选用车尔臣河、克孜勒河和阿克苏河 3 个不同地理种群的塔里木裂腹鱼共计 126 尾样本, 进行线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 基因序列的对比分析, 探讨 2 种标记对塔里木裂腹鱼遗传多样性分析结果的差异和关系。结果显示, 塔里木裂腹鱼线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 基因序列的 A+T 含量均高于 G+C 含量, 碱基组成具有偏倚性。基于线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 基因序列分析, 3 个群体 126 个样本中分别确定了 6 个和 23 个单倍型, 其中线粒体 DNA *COII* 基因序列中存在共享单倍型现象, *ND4* 基因序列中未发现共享单倍型。2 种标记下群体的单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 $0.738 \pm 0.019/0.904 \pm 0.014$ 和 $0.021\ 29 \pm 0.002\ 98/0.048\ 76 \pm 0.001\ 49$, 呈现出高单倍型多态性和高核苷酸多态性的特征。2 种标记的分子方差分析 (AMOVA) 均表明, 在所有群体中遗传变异主要来源于群体间, 且车尔臣河群体的塔里木裂腹鱼与其他 2 个群体的遗传分化均达到显著水平。贝叶斯法 (BI) 构建的 BI 树与单倍型网络图结构一致, 塔里木裂腹鱼形成了 2 个分支。*COII* 和 *ND4* 基因序列的歧点分布图均呈现双峰型, 表明塔里木裂腹鱼现在的分布是先前分化种群发生二次交流的结果。研究表明, 塔里木裂腹鱼已分化出 2 个明显的地理种群, 建议在进行种质资源保护以及开发利用时将车尔臣河群体作为一个单独的种群管理。

关键词: 塔里木裂腹鱼; 遗传多样性; 线粒体 DNA; *COII*; *ND4*

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

塔里木裂腹鱼 (*Schizothorax biddulphi*) 为鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼属 (*Schizothorax*) 鱼类^[1-2], 曾用名: 尖嘴臀鳞鱼、塔里木弓鱼、尖嘴裂尻鱼和尖嘴鱼, 目前仅分布在新疆维吾尔自治区塔里木河水系的湖泊和河道静水水体中, 为塔里木河水系的标志性物种。20 世纪 50—60 年代, 占博斯腾湖渔获物组成的 80%,

最大个体体质量可达 5000 g, 1961 年平均体质量为 1500 g, 1977 年下降到平均 200 g^[3]。于 1998 年被《中国濒危动物红皮书》(鱼类卷) 收录^[1]。从水平分布范围来看, 目前主要分布在塔里木河水系的阿克苏河、渭干河、叶尔羌河和田河, 同时于克孜勒河和车尔臣河等河流中也有少量分布; 从垂直分布来看, 塔里木裂腹鱼主要种群分布在

收稿日期: 2020-05-14 修回日期: 2021-05-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31560721, 31860729); 新疆生产建设兵团中青年科技创新领军人才计划项目 (2018CB033); 中国海洋大学-塔里木大学联合基金项目 (ZHYLH201902); 塔里木大学校长基金创新研究团队项目 (TDZKXC202204); 华中农业大学塔里木大学科研合作联合基金项目 (TDHNLH201702、2662017PY118)

第一作者: 任永丽, 从事水生生物资源保护与利用研究, E-mail: renyongli2017@163.com

通信作者: 聂竹兰 (照片), 从事水生生物资源保护与利用研究, E-mail: niezhil2004@163.com



1 000~3 300 m 范围内, 而在部分支流下游和干流季节性断流河段, 塔里木裂腹鱼基本绝迹^[4-6]。该鱼在 2004 年正式列入新疆维吾尔自治区重点保护水生野生动物名录[新政发(2004) 67 号], 2021 年升级为国家二级保护鱼类, 成为塔里木河水系的濒危保护鱼类之一。

目前, 分子标记技术在水生生物的群体遗传学研究中得到了较为广泛的应用。其中线粒体 DNA 标记以其结构简单、重组率低、进化速度快等优点^[7-8], 被普遍应用在鱼类的亲缘关系、遗传多样性、种群遗传进化和种群历史动态等研究中。其中, 线粒体 DNA 的 *COII* 和 *ND4* 序列已用于多个物种的种群遗传学研究^[9-11]。*COII* 基因是 mtDNA 13 个蛋白质编码基因之一, 该基因的产物是细胞色素氧化酶亚基 II, 是细胞色素氧化酶的重要组成部分。*ND4* 基因是线粒体中编码 NADH 氧化还原酶第 4 个亚基的基因, 在动物线粒体编码基因中, *ND4* 基因进化较快, 多态性丰富, 是研究群体遗传的极好标记, 适用于分析亲缘关系较近群体的系统发育关系和群体遗传结构^[12-13]。本研究以 3 个群体的塔里木裂腹鱼为研究对象, 利用线粒体 *COII* 和 *ND4* 序列探讨塔里木裂腹鱼群体的遗传结构及它们之间的遗传关系, 筛选出具有较高遗传多样性的群体, 进而为塔里木裂腹鱼的资源利用、合理保护以及分子标记辅助育种等方面的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2017 年 7 月至 2019 年 7 月共采集塔里木裂腹鱼 3 个群体共 126 尾鳍条样本, 包括车尔臣河(CEC) 44 尾、克孜勒河(KZL) 69 尾以及阿克苏河(AKS) 13 尾。所有样本均保存在无水乙醇中, 带回实验室置于-20℃ 冰箱中备用。采样点见图 1。

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 采用天根生化科技(北京)有限公司购买的动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)提取基因组 DNA, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并用核酸蛋白检测仪测定其浓度及纯度, 将合格样品稀释至 100 ng/μL, 置于-20℃ 冰箱保存备用。

线粒体 *COII* 和 *ND4* 基因的扩增及测序 根据 GenBank 中已经公布的塔里木裂腹鱼线粒体基因组序列(GenBank 登录号 NC_017873.1), 利用 Primer premier 5 软件设计线粒体 *COII* 和 *ND4* 序列特异性引物, 送生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。引物序列:

COII-F: 5'-AATCCCTGCATGTCTTAG-3'

COII-R: 5'-GGAGTTGGTTCATTTGGT-3'

ND4-F: 5'-CGACCGTCTACAAAACCT-3'

ND4-R: 5'-ATTTCAAGTTCCTCCTTGG-3'

PCR 反应总体积为 50 μL, 包含 *R*Taq DNA

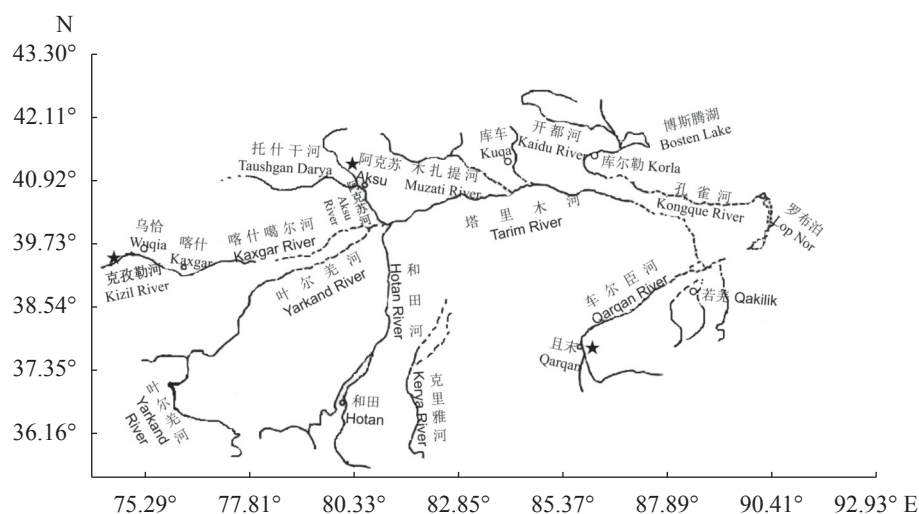


图 1 塔里木裂腹鱼群体采样点分布

★. 采样点

Fig. 1 Distribution of population sampling points for *S. biddulphi*

★. sampling points

Premix 25 μL , 基因组 DNA 2 μL , 上、下游引物各 1 μL , ddH₂O 为 21 μL 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 各引物的最佳退火温度 T_m 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验, 合格样品送于生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 其中线粒体 *COII* 基因片段采用双向测序, *ND4* 基因片段采用正向测序。

1.3 数据分析

采用 MEGA 7.0 软件对序列进行多重比对, 并辅之人工校对, 除去两端不确定的核苷酸序列, 截取同等长度的有效序列。比对以 GenBank 中的塔里木裂腹鱼线粒体 *COII* 和 *ND4* 基因序列作为参照。同时通过 MEGA 7.0 来统计比对后序列的碱基组成、单一变异位点 (V)、简约信息位点 (P) 以及进行不同群体两两间遗传距离 (D) 的计算。DnaSP v5.10 软件用来分析各群体以及总体的单倍型数 (N)、单倍型多态性 (H_d)、核苷酸多态性 (π) 和平均核苷酸差异 (K) 等遗传多样性指数, 同时获得对种群内两两核苷酸序列差异进行比较分析的歧点分布图, 以分析种群的历史动态。用 Arlequin311 软件计算群体间的遗传分化系数 (F_{st}), 并基于单倍型频率的分子方差 (AMOVA) 来分析群体间的遗传变异。MrBayes v.3.1.1 软件采用贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 构建 BI 树。为了描述单倍型序列的系统发育关系以及地理关系, 采用 Network 5.0 (Rohl 2003) 软件基于中间连接法建立单倍型网络图。

2 结果

2.1 线粒体 *COII* 和 *ND4* 基因序列的碱基组成和序列变异

测序比对后, 获得塔里木裂腹鱼线粒体 *COII* 基因序列的长度为 691 bp, 基因序列碱基 T、C、A、G 的平均含量分别为 27.8%、25.4%、30.6% 和 16.2%, A+T 和 G+C 的平均含量为 58.4% 和 41.6%; *ND4* 基因序列的长度为 1381 bp, 基因序列碱基 T、C、A、G 的平均含量分别为 25.8%、29.0%、28.3%、16.9%, A+T 和 G+C 的平均含量为 54.1% 和 45.9%, A/T 碱基含量明显高于 C/G 碱基含量, 符合硬骨鱼类线粒体基因组碱基组成含量特征。

在 126 个塔里木裂腹鱼个体线粒体 *COII* 序列中, 共检测到 170 个变异位点, 占总位点数的

24.60%。其中简约信息位点 47 个, 单碱基突变位点 123 个。线粒体 *COII* 基因序列中发生转换的位点 14 个, 明显多于颠换位点 (5 个), 平均转换与颠换比为 2.6。线粒体 *ND4* 基因序列中共检测到 174 个变异位点, 占总位点数的 12.60%。其中简约信息位点 165 个, 单碱基突变位点 9 个。线粒体 *ND4* 基因序列中发生转换的位点 60 个, 比颠换位点 (9 个) 多, 平均转换与颠换比值为 6.8。

2.2 塔里木裂腹鱼群体遗传多样性分析

基于线粒体 *COII* 基因序列共定义了 6 个单倍型, 其中 KZL 群体所占的单倍型数量最多, 其次为 CEC 群体, AKS 群体最少。所有单倍型中, Hap1 为共享单倍型且所占个体数量最多 (48 个), 占比 38.1%; Hap2 和 Hap3 是 CEC 群体特有单倍型, 且 Hap2 所占个体数量最少, 仅有 1 个; Hap4 和 Hap5 是 KZL 群体特有单倍型。3 个种群 H_d 为 0.738 ± 0.019 , π 为 0.02129 ± 0.00298 , K 为 13.729。根据各个群体的多态性研究结果发现 (表 1), 本研究中 KZL 群体的样本量 (N) 和单倍型数量 (h) 都大于 CEC 群体和 AKS 群体, 但在多样性水平分析中, 除 CEC 群体的单倍型多态性明显低于 KZL 和 AKS 群体外, KZL 群体的核苷酸多态性和平均核苷酸差异数在 3 个群体中最低。

基于 126 条 *ND4* 基因序列共定义 23 个单倍型, 3 个群体之间没有共享单倍型; Hap13 在所有单倍型中, 所占个体数量最多 (28 个), 占比 22.2%; 单倍型 Hap1-2、Hap4-5 和 Hap7-11 是 CEC 群体特有的单倍型, 而 Hap12-15 和 Hap17-18 是 KZL 群体特有的单倍型, AKS 群体的特有单倍型数仅有 4 个, 分别为 Hap20、Hap21、Hap22 和 Hap23; CEC 群体和 KZL 群体共有的单倍型为 Hap3 和 Hap6, KZL 群体和 AKS 群体的共享单倍型为 Hap16 和 Hap19, 而 CEC 群体和 AKS 群体并没有共享单倍型。3 个群体总的多态性分析结果显示, 单倍型多态性为 0.904 ± 0.014 , 核苷酸多态性为 0.04876 ± 0.00149 , 平均核苷酸差异数为 62.212。通过比较分析发现, 本研究中 CEC 群体的单倍型数量最多, 为 13 个, 其次为 KZL 群体, AKS 群体最少, 仅为 6 个; 相对于 KZL 群体和 AKS 群体来说, CEC 群体具有最大的单倍型多态性, 但核苷酸多态性和平均核苷酸差异数最小 (表 1)。

2.3 塔里木裂腹鱼群体间的遗传距离和遗传分化

基于 Kimura-2-parameter 模型, 采用 Bootstrap 值 (1 000 次) 进行 3 个不同群体的线粒体

表 1 基于线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 序列的 3 个塔里木裂腹鱼群体的遗传信息

Tab. 1 Genetic information of three populations of *S. biddulphi* based on mitochondrial *COII* and *ND4* gene

群体 population	样本/个 samples	基因 genes	单倍型数 H	单倍型多态性 H_d	核苷酸多态性 π	平均核苷酸差异 K
车尔臣 CEC	44	<i>COII</i>	6	0.433±0.091	0.009 24±0.007 87	6.033
		<i>ND4</i>	13	0.887±0.025	0.003 28±0.000 33	4.455
克孜勒 KZL	69	<i>COII</i>	17	0.830±0.032	0.007 67±0.002 05	5.211
		<i>ND4</i>	10	0.747±0.035	0.018 85±0.005 61	24.057
阿克苏 AKS	13	<i>COII</i>	9	0.910±0.068	0.014 21±0.005 51	9.692
		<i>ND4</i>	6	0.821±0.082	0.028 39±0.013 66	37.846

COII 和 *ND4* 基因序列遗传距离检验。基于线粒体 *COII* 基因序列, 两两群体间的遗传距离在 0.009~0.040, 其中 AKS 群体与 KZL 群体的遗传距离最小, 亲缘关系最近, CEC 群体与 KZL 群体的遗传距离最大, 亲缘关系最远; 且 CEC 群体与 KZL 和 AKS 群体之间存在显著的遗传分化 ($P<0.05$), KZL 群体和 AKS 群体之间遗传分化不显著 (表 2)。AMOVA 分析结果显示, 73.83% 的遗传变异发生在群体间, 26.17% 的遗传变异发生在群体内, 各群体间存在极显著水平的遗传分化 ($F_{st}=0.74$, $P<0.001$) (表 3)。

基于线粒体 *ND4* 基因序列, 3 个群体之间的遗传距离为 0.026~0.096, 其中 AKS 群体和 KZL 群体之间的遗传距离最小 (0.026), 而 CEC 群体和 KZL 以及 AKS 群体的遗传距离均较大, 分别为 0.096 和 0.091; 且 CEC 群体与 KZL 以及 AKS 群体之间产生了显著的遗传分化 ($P<0.05$), 遗传分化指数分别为 0.858 和 0.888, 而 KZL 群体和

表 2 基于线粒体 *COII* 和 *ND4* 序列的塔里木裂腹鱼两两群体间的遗传距离 D (对角线以上) 和 F_{ST} (对角线以下)

Tab. 2 Genetic distance D (above diagonal) and F_{ST} values for pairwise comparison (below diagonal) among the three populations of *S. biddulphi* in *COII* and *ND4* gene

群体 population	车尔臣河 CEC	克孜勒河 KZL	阿克苏河 AKS
车尔臣河 CEC		0.040/0.096	0.038/0.091
克孜勒河 KZL	0.786*/0.858*		0.009/0.026
阿克苏河 AKS	0.717*/0.888*	0.080/0.026	

注: * 表示显著性水平 $P<0.05$; 斜线左侧为 *COII* 参数, 右侧为 *ND4* 参数, 下同

Notes: * indicates significant level $P<0.05$; left of slash for *COII* parameter, right of slash for *ND4* parameter, the same below

AKS 群体之间遗传分化不显著 (表 2)。AMOVA 分析结果显示, 塔里木裂腹鱼 80.94% 的遗传变异发生在群体间, 19.06% 的遗传变异发生在群体内, 各群体间存在极显著水平的遗传分化 ($F_{st}=0.81$, $P<0.001$) (表 3)。

表 3 塔里木裂腹鱼分子变异的方差分析

Tab. 3 AMOVA results of *S. biddulphi* among three populations

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分比/% percentage of variation	遗传固定系数 F_{st}
种群间 among populations	2	571.652/2 903.243	7.916 Va/40.335 Va	73.83/80.94	
种群内 within populations	123	345.141/1 168.075	2.806 Vb/9.497 Vb	26.17/19.06	
总计 total	125	916.794/4 071.317	10.722/49.831		0.74**/0.81**

注: ** 表示显著性水平 $P<0.001$

Note: ** indicates significant level $P<0.001$

2.4 塔里木裂腹鱼单倍型间的进化关系

基于线粒体 *COII* 基因序列的 6 个单倍型, 以黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*) 和贝加尔雅罗鱼 (*Leuciscus baicalensis*) 为外群, 采用贝叶斯法构建系统进化树 (图 2)。结果显示, 塔里木裂腹鱼的单倍型被划分为 2 个分支结构, 分支 I 包含 3 个群体的单倍型, 但 CEC 群体占大多数; 分

支 II 由多数 KZL 群体的单倍型以及少数 AKS 群体的单倍型构成。单倍型网络图结构与 BI 树完全一致 (图 3)。所有线粒体 *COII* 基因序列的单倍型错配分布图呈现双峰现象 (图 4), 且总群体的 Tajima's D 检测为负值, 不显著 ($P>0.10$), 反映出塔里木裂腹鱼拥有 2 个单倍型群组。

基于线粒体 *ND4* 基因序列的 23 个单倍型构

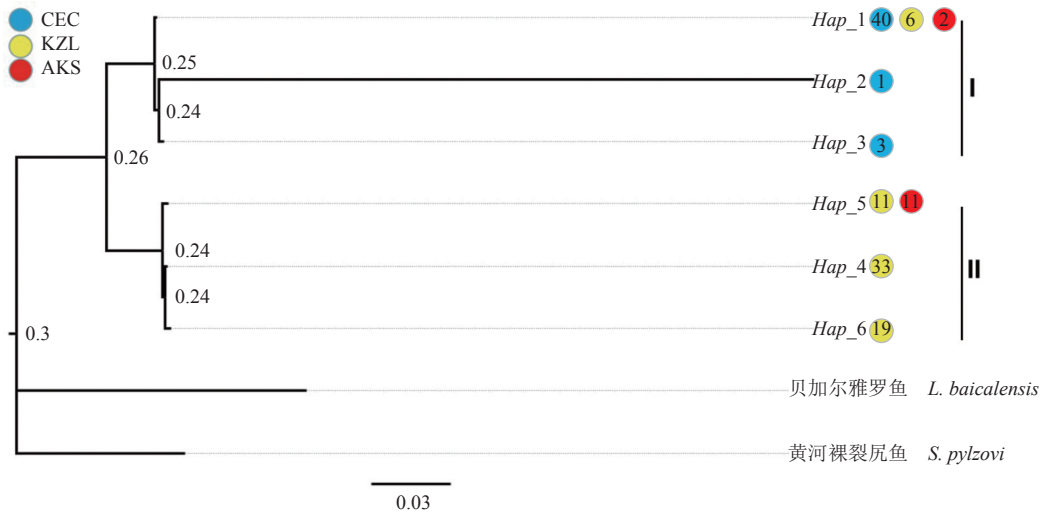


图 2 基于 COII 基因序列的单倍型 BI 树

树节点处为后验概率，圆圈数字为该单倍型出现次数，圆圈的颜色表示地理区域；下同

Fig. 2 BI phylogenetic tree based on COII gene sequence

Values at nodes are posterior probabilities, figure in the circle represents the number of times that the haplotype occurs, and the colors of the circles indicate the geographic region; the same below

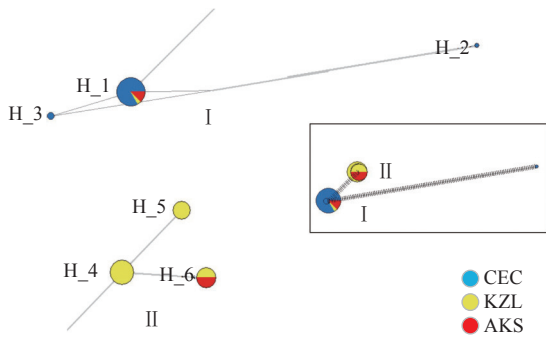


图 3 基于线粒体 DNA COII 序列的塔里木裂腹鱼单倍型网络图

不同的圆圈代表不同的单倍型，其相对大小与观察到的频率成正比；圆圈的颜色表示地理区域，数字代表单倍型名称；图 6 同

Fig. 3 Network of S. bidulphi based on concatenated mtDNA COII sequences haplotypes

Different circles represent different haplotypes with relative size proportionate to its observed frequency; the colors of the circles indicate the geographic region, the number labels represent haplotypes names; the same as fig.6

建的 BI 树显示，所有单倍型被划分为 2 个分支结构 (图 5)。分支 I 的单倍型主要由 CEC 群体构成，且种类最多，共有 15 个单倍型，占到单倍型总数的 65.2%，还包括少数 KZL 和 AKS 群体的单倍型。分支 II 中所有单倍型均来自于 KZL 群体和 AKS 群体，与 CEC 群体间无共享单倍型。单倍型网络图结构与 BI 树完全一致 (图 6)。所有线粒体 COII 基因序列的单倍型错配分布图呈现明显的双峰分

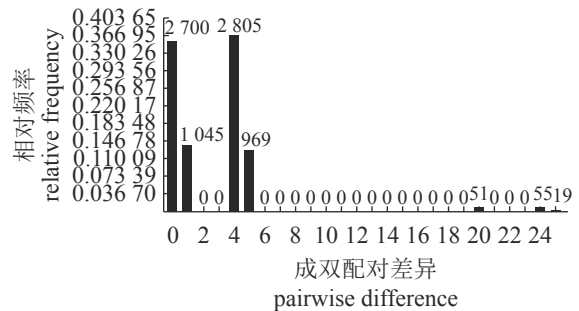


图 4 塔里木裂腹鱼线粒体 COII 基因序列的单倍型错配分布图

Fig. 4 Mismatch distribution of COII haplotypes of S. bidulphi

布 (图 7)，与 COII 基因序列得出的结果一致，且总群体的 Tajima's D 检测为正值，极显著 (P<0.001)，表明塔里木裂腹鱼具有 2 个明显的单倍型类群。

3 讨论

3.1 塔里木裂腹鱼线粒体 DNA COII、ND4 碱基组成和序列变异分析

线粒体基因组中 A、T、G、C 的分布呈现不均一性^[14]，而碱基 A+T 含量高的线粒体基因在进化中更具优势^[15]。本研究塔里木裂腹鱼线粒体 DNA COII 基因序列的 A+T 和 G+C 平均含量分别为 58.4% 和 41.6%；ND4 基因序列的 A+T 和 G+C 平均含量为 54.1% 和 45.9%。A/T 碱基的含量均明

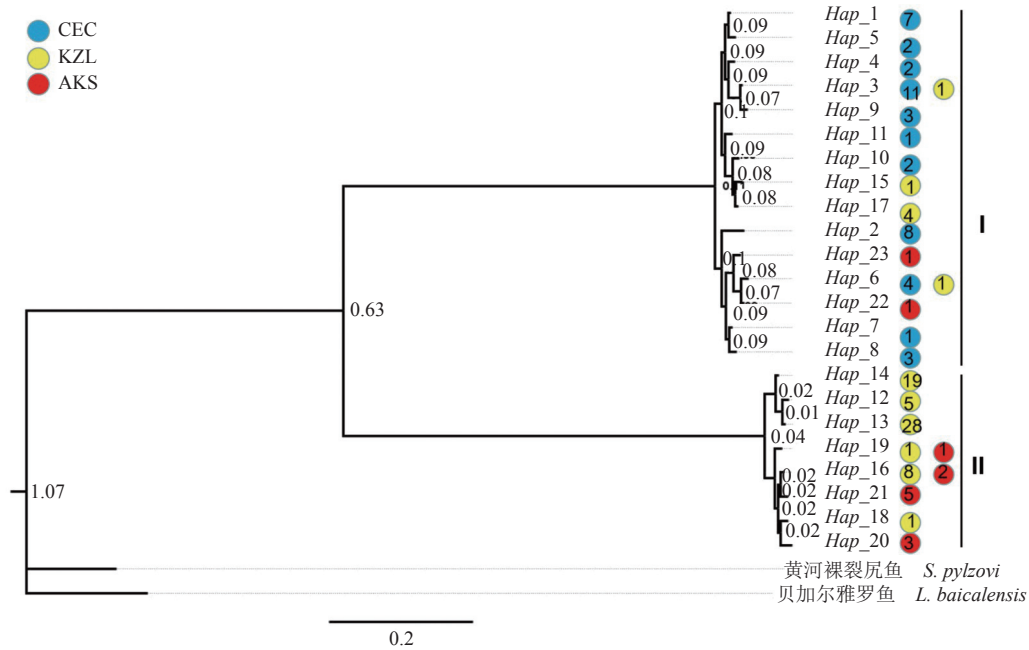


图 5 基于 ND4 基因序列的单倍型 BI 树

Fig. 5 BI phylogenetic tree based on of ND4 gene sequence

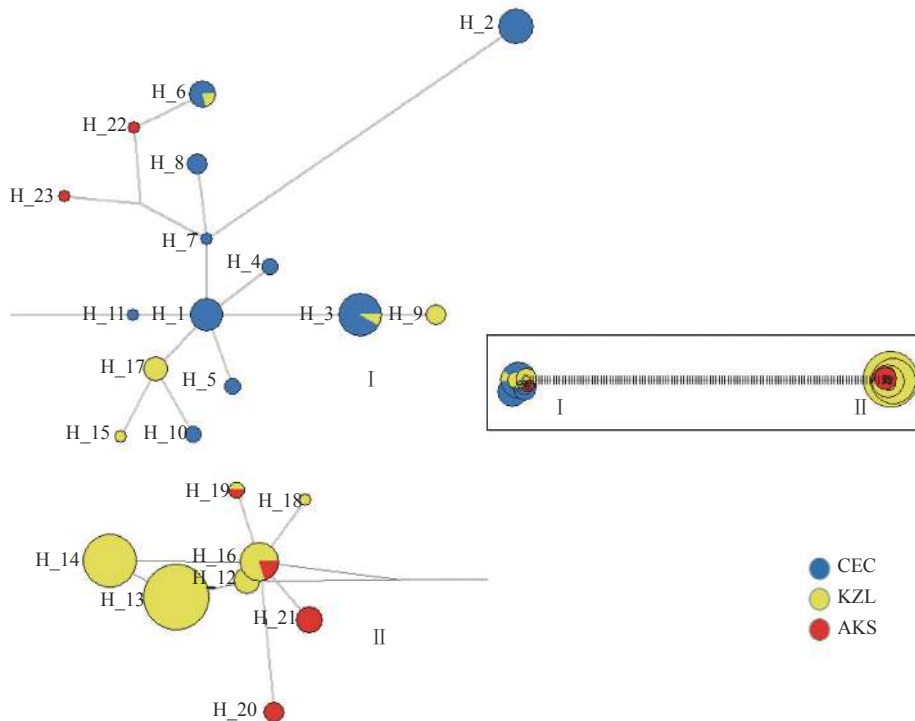


图 6 基于线粒体 DNA ND4 序列的塔里木裂腹鱼单倍型网络聚类图

Fig. 6 Network of *S. biddulphi* based on concatenated mtDNA ND4 sequences haplotypes

显高于 C/G 碱基的含量, 表现出明显的碱基组成偏向性, 这与其他鱼类线粒体 DNA COII 和 ND4 基因序列结果类似^[16-18], 表明 A+T 含量较高可能也是鱼类线粒体 DNA COII 基因和 ND4 基因序列组成中普遍存在的现象。

本研究获得的 3 个群体的塔里木裂腹鱼线粒体 DNA COII 和 ND4 基因序列长度分别为 691bp 和 1 381bp。COII 基因序列共检测到 170 个变异位点, 占分析位点总数的 24.60%, 变异程度不同于 ND4 基因序列检测的 174 个变异位点 (12.6%), 这

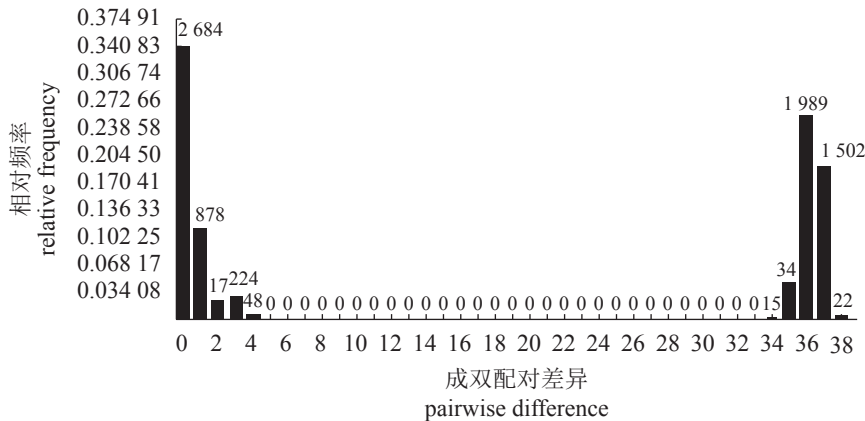


图7 塔里木裂腹鱼线粒体 *ND4* 基因序列的单倍型错配分布图

Fig. 7 Mismatch distribution of *ND4* haplotypes of *S. biddulphi*

可能是由于线粒体 DNA 不同区域核苷酸的突变速率或者是不同基因片的选择压力不同, 进而导致线粒体不同片段的核苷酸变异存在差异。线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 基因序列的平均转换与颠换比值为 2.6 和 6.8, 可见塔里木裂腹鱼 2 种线粒体 DNA 序列的变异多发生在嘌呤之间或者嘧啶之间, 这一结果也与阎雪岚等^[19] 和杨天燕等^[20] 的研究结果一致, 对比发现, 塔里木裂腹鱼线粒体基因序列的转换与颠换比值的大小依次为 *COI*^[20]>*ND4*>*Cyt b*^[19]>*COII*。

3.2 塔里木裂腹鱼群体遗传多样性分析

单倍型多态性和核苷酸多态性是 2 个用来判定遗传多样性的重要指标。本研究中, 基于线粒体 DNA *COII* 基因序列, 塔里木裂腹鱼群体的单倍型多态性和核苷酸多态性分别为 0.738 ± 0.019 和 $0.021\ 29 \pm 0.002\ 98$, 高于阎雪岚等^[19] 通过线粒体 DNA *Cyt b* 基因序列对塔里木裂腹鱼的研究结果 ($H_d = 0.525\ 4 \pm 0.071\ 0$, $\pi = 0.000\ 93 \pm 0.000\ 86$), 低于海萨·艾也力汗等^[21] 基于线粒体控制区对塔里木裂腹鱼的研究 ($H_d = 0.958 \pm 0.005$, $\pi = 0.023\ 6 \pm 0.001\ 6$); 而基于线粒体 DNA *ND4* 基因序列的塔里木裂腹鱼单倍型多态性和核苷酸多态性分别是 0.904 ± 0.014 和 $0.048\ 76 \pm 0.001\ 49$, 高于杨天燕等^[22] 对塔里木裂腹鱼 *COI* 基因序列的研究结果 ($H_d = 0.733$, $\pi = 0.001\ 58$), 且与海萨·艾也力汗等^[21] 的研究结果相近。综上可知, 利用不同的基因序列, 所得到塔里木裂腹鱼遗传多样性的大小各不相同。一方面可能与线粒体不同序列的保守性差别有关, 另一方面可能与采集地以及采集样本数量有关。Grant 等^[23] 分析单倍型多态性和核苷酸多态性值

的大小后, 提出了 4 种模式, 低单倍型多态性 (<0.5) 与低核苷酸多样性 (<0.005), 表明瓶颈效应或者是奠基者事件可能在种群中发生了; 高单倍型多态性 (≥ 0.5) 与低核苷酸多态性 (<0.005), 说明种群发生瓶颈效应后同时又伴随着种群的快速增长和累积突变; 低单倍型多态性 (<0.5) 与高核苷酸多态性 (≥ 0.005), 说明地理种群的再分化引起的分歧; 高单倍型多态性 (≥ 0.5) 与高核苷酸多态性 (≥ 0.005), 说明大而稳定的种群有着长期的进化历史, 或者由于不同分化的谱系出现了二次交流。根据这一标准, 本研究中塔里木裂腹鱼均属于高单倍型多态性和高核苷酸多态性, 推测塔里木裂腹鱼种群之间分化的不同谱系间发生了二次交流。

3.3 塔里木裂腹鱼群体遗传结构

基于线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 基因序列分析了塔里木裂腹鱼群体间的遗传距离和遗传分化。根井正利^[24] 在定量估算物种的不同分类单位之间的遗传变异水平时提出, 种群间遗传距离的范围是 0~0.05, 亚种间是 0.02~0.20。Shaklee 等^[25] 指出 0.90、0.30 和 0.05 分别是鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离的分类依据。塔里木裂腹鱼线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 基因序列的研究结果均显示, AKS 与 KZL2 个群体之间遗传分化较小, 遗传距离未达到亚种分化水平; 而 CEC 群体与上述 2 个群体之间均产生了较大的遗传分化, 且群体间的遗传距离 (0.038/0.091 和 0.040/0.096) 也达到了亚种分化水平; AMOVA 分析结果也显示, 塔里木裂腹鱼的遗传变异主要来源于种群间, 而非种群内部。但多数研究的结果表明, 裂腹鱼类的种群分化程度呈现出比较低的状态^[26-27]。首先

推测本研究中塔里木裂腹鱼 AKS 群体与 KZL 群体之间遗传分化较小的原因是 KZL 属于喀什噶尔河的上游支流, 而喀什噶尔河发源于帕米尔与北部天山支脉阿里山, 最终向东流入塔里木河, 而 AKS 是塔里木河的主要支流, 所以 2 个种群之间存在广泛的基因交流, 虽然目前喀什噶尔河已与塔里木河干流脱离, 但脱离的时间较短, 进而产生的遗传分化较小; 而 CEC 与其他 2 个群体之间产生较大遗传分化的原因: 早在公元 6 世纪以前, 塔里木河干流和 CEC 交汇于罗布泊, 塔里木河流域与 CEC 流域中水生生物之间的基因交流直接受到罗布泊演化的影响^[28]。有研究显示, 罗布泊出现于大约 5 Ma 前的上中新世, 由于气候原因, 曾于上新世末期干涸, 随后的 2.7—1.5 Ma 气候逐渐好转, 干燥度降低, 于 1.5 Ma 前罗布泊水面恢复^[29-31]。推测 CEC 群体与其他群体间的遗传分化可能是在罗布泊干枯这一时期造成的, 罗布泊干枯导致 CEC 群体与其他群体之间产生了地理隔离, 造成其生境的破碎化, 进而产生了较大的遗传分化。虽然目前 CEC 与塔里木河交汇于台特玛湖, 适当增加了群体间的基因交流, 但车尔臣河群体与其他群体之间的遗传分化仍是显著存在的。对于水生生物来说, 不同水域之间的地理隔离障碍, 通常会产生明显的种群遗传分化, 即鱼类分布的水系格局往往决定着其遗传分化格局^[32]。此外, 研究发现, 3 个群体塔里木裂腹鱼线粒体 DNA *COII* 基因序列中仅有 1 个共享单倍型; 而 *ND4* 序列结果中, 未发现存在共有单倍型。通过贝叶斯法构建的单倍型系统发育关系树也显示 3 个种群聚为 2 个谱系, 这也进一步显示出塔里木裂腹鱼 3 个群体之间已经分化出 2 个明显的地理种群。当结合形态学特征判定生物种群的分化程度时, 通常是通过比较不同地理种群间的差异系数 (coefficient of difference, C.D) 来进行形态特征的差异分析, 若 $C.D > 1.28$, 表明种群之间形态差异比较大, 已经达到亚种分化水平。本课题组在比较阿克苏河、克孜勒河以及车尔臣河 3 个不同地理种群间塔里木裂腹鱼形态特征差异时得出, KZL 群体和 CEC 群体的塔里木裂腹鱼在头长/体长、吻长/体长、体高/体长以及尾柄高/体长 4 个传统形态学指标上的差异系数均大于 1.28, 表明这 2 个群体在以上 4 个形态学指标方面的差异已经达到了亚种分化水平, 而 3 个群体间地理种群的分化以及形态学方面的差异是否导致塔里木裂腹鱼新亚种形成的原因, 仍需通过生理生化指标以及生态学等

更多更有意义的探究来补充和完善, 但建议在进行种质资源保护以及开发利用时将 CEC 群体作为一个单独的种群管理。

3.4 塔里木裂腹鱼种群历史动态

核苷酸配对差异分布分析以及中性检验是 2 个研究种群历史动态有效的检验方法。对于一个在过去处于平衡状态的群体而言, 核苷酸不配对差异分析呈现多峰现象, Tajima's *D* 中性检验值不显著; 如果群体曾在历史上遭受过扩张或者有持续增长的现象发生, 那么其核苷酸不配对分布曲线结果将呈现出单峰分布的特征, 其值将会显著偏离中性突变^[33-34]。本研究通过线粒体单倍型序列信息进行塔里木裂腹鱼核苷酸的配对差异分布分析, 发现塔里木裂腹鱼 2 种线粒体 DNA 基因序列的单倍型错配分布均呈现双峰型, 且 Tajima's *D* 值无论从单个群体分析还是作为一个整体分析, 均没有呈现显著的负值, 故推测塔里木裂腹鱼在历史上未发生过群体扩张事件。

Network 软件构建的线粒体 DNA *COII* 和 *ND4* 单倍型网络结构图显示, 所有单倍型分为明显的 2 组。单倍型错配分布图的双峰现象与海萨·艾也力汗等^[21] 所研究的结果一致, 推测之前分化的种群在之后发生了二次联系和遗传融合现象^[35], 即在经历罗布泊干枯事件以后, 因塔里木盆地的冷湿性气候, 致使 CEC 群体和其他群体之间相互扩散, 发生了基因交流, 这也进一步验证了单倍型多样性和核苷酸多样性的分析结果。

3.5 2 种线粒体分子标记的比较

2 种线粒体 DNA 分子标记在分析塔里木裂腹鱼不同群体间的遗传结构以及分子变异分析时, 得到了相同的结论, 表明这 2 种线粒体 DNA 分子标记都适用于塔里木裂腹鱼的种群遗传多样性研究。但在遗传多样性分析方面的结果出现了差异, 即将 3 个群体作为一个整体时, 2 种线粒体 DNA 分子标记均显示, 塔里木裂腹鱼具有高单倍型多态性以及高核苷酸多态性的特征, 而就单个群体分析, 却出现不同的结果。基于线粒体 DNA *COII* 分子标记可知, AKS 群体的遗传多样性在所有群体中最高, 而 CEC 群体的遗传多样性相对最低。而根据线粒体 DNA *ND4* 分子标记结果, CEC 群体呈现出高单倍型多态性和低核苷酸多态性的特征, 推测脊椎动物线粒体 DNA 不同序列的进化

速率不同从而导致线粒体各个基因的遗传信息也有所不同^[36], 故通过选取 mtDNA 上的不同基因或片段序列, 可用于在不同分类水平上的进化研究。如果物种之间的亲缘关系比较近, 就选用压力小、进化相对较快的 DNA 序列; 如果物种的亲缘关系较远, 就选择压力大、并相对保守的 DNA 序列^[37]。如 mtDNA D-Loop 区序列的进化速度比较快, 常用于种内群体间的遗传分化分析, 本研究中 *ND4* 基因序列的结果与海萨·艾也力汗等^[21]通过线粒体控制区获得的结果一致, 进而推测, 在本研究中线粒体 DNA *ND4* 基因序列较 *COII* 基因序列在塔里木裂腹鱼群体遗传多样性的研究中具有更好的适用性。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书: 鱼类 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 147-149.
Yue P Q, Chen Y Y. China red data book of endangered animals: pisces[M]. Beijing: Science Press, 1998: 147-149 (in Chinese).
- [2] 王德忠. 新疆的裂腹鱼亚科鱼类研究[J]. 干旱区研究, 1998, 15(4): 26-32.
Wang D Z. The Schizothoracinae fishes in Xinjiang[J]. Arid Zone Research, 1998, 15(4): 26-32 (in Chinese).
- [3] 郭焱, 张人铭, 蔡林刚, 等. 博斯腾湖鱼类资源及渔业 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2005: 117-120.
Guo Y, Zhang R M, Cai L G, et al. Fishery resources and fisheries of the Bosten Lake[M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2005: 117-120 (in Chinese).
- [4] 谢春刚, 马燕武, 郭焱. 塔里木盆地鱼类生物地理学初步解析[J]. 水产学杂志, 2015, 28(2): 40-46.
Xie C G, Ma Y W, Guo Y. Analysis of biogeography of fishes in Tarim Basin[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(2): 40-46 (in Chinese).
- [5] 张人铭, 郭焱, 马燕武, 等. 塔里木裂腹鱼资源与分布的调查研究[J]. 淡水渔业, 2007, 37(6): 76-78.
Zhang R M, Guo Y, Ma Y W, et al. A survey on the resource and distribution of *Schizothorax biddulphi* Günther[J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(6): 76-78 (in Chinese).
- [6] 马燕武, 郭焱, 张人铭, 等. 新疆塔里木河水系土著鱼类区系组成与分布[J]. 水产学报, 2009, 33(6): 949-956.
Ma Y W, Guo Y, Zhang R M, et al. Fauna composition and distribution of aboriginal fish in the Tarim River of Xinjiang Uygur Autonomous Region[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(6): 949-956 (in Chinese).
- [7] Meland S, Johansen S, Johansen T, et al. Rapid disappearance of one parental mitochondrial genotype after isogamous mating in the myxomycete *Physarum polycephalum*[J]. Current Genetics, 1991, 19(1): 55-59.
- [8] 赵凯. 鱼类线粒体DNA(mtDNA)及其在分子系统学中的应用[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2006, 24(2): 49-53.
Zhao K. Mitochondrial DNA (mtDNA) of fish and application in molecular phylogenetics[J]. Journal of Qinghai University (Nature Science), 2006, 24(2): 49-53 (in Chinese).
- [9] 吕耀平, 胡则辉, 肖建中, 等. 5种体色瓯江彩鲤线粒体 *COII* 基因的序列差异和遗传标记研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2009, 36(3): 323-327, 334.
Lv Y P, Hu Z H, Xiao J Z, et al. Intraspecific DNA sequence polymorphism and genetic markers in the mitochondrial *COII* gene from five color patterns of Oujiang color carp[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2009, 36(3): 323-327, 334 (in Chinese).
- [10] 丁言伟, 彭作刚, 张训蒲, 等. 黄颡鱼属两种鱼类的线粒体 *ND4* 基因序列变异性分析[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 413-419.
Ding Y W, Peng Z G, Zhang X P, et al. Mitochondrial DNA *ND4* gene sequences variation of two *Pelteobagrus* species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(4): 413-419 (in Chinese).
- [11] 程双怀, 魏世祥, 张逸, 等. 基于 *ND4* 和 *ND5* 基因序列研究八种臂尾轮虫的系统关系和分类地位[J]. 水产学报, 2016, 40(12): 1823-1829.
Cheng S H, Wei S X, Zhang Y, et al. Phylogenetic relationship and taxonomic status of eight *Brachionus* species (Rotifera) inferred from *ND4* and *ND5* genes[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(12): 1823-1829 (in Chinese).
- [12] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[M]//Mochachka P W, Mommsen T P. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. New York: Elsevier, 1993: 1-38.

- [13] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(7): 933-942.
- [14] Brown W M. Evolution of the animal mitochondrial DNA genome[M]/MacIntyre R J. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum Press, 1985: 95-130.
- [15] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [16] 张际峰, 郝培应, 聂刘旺, 等. 2种银鱼线粒体 *COII* 及侧翼 tRNA 基因的测定分析及其亲缘关系研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(3): 424-428.
Zhang J F, Hao P Y, Nie L W, *et al.* Studies on the analysis of sequences of *COII* and its connected tRNA genes of mitochondrial genome from 2 species of salangidae and their phylogenetic relationship[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(3): 424-428 (in Chinese).
- [17] 李福贵, 邹曙明. 亚东鲑线粒体 *CO I* 与 *COII* 基因遗传多样性分析[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(23): 7710-7713.
Li F G, Zou S M. Genetic diversity analysis of *Salmo truttafario* based on *COI* and *COII*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(23): 7710-7713 (in Chinese).
- [18] 杜民, 李娜, 牛宝珍, 等. 6个巨鲈群体线粒体 *ND4* 基因碱基序列多样性分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(1): 103-107.
Du M, Li N, Niu B Z, *et al.* Diversity of base sequences of mitochondrial *ND4* gene in six populations of *Bagarius yarrelli*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 103-107 (in Chinese).
- [19] 阎雪岚, 杨金权, 唐文乔, 等. 基于线粒体 *Cyt b* 基因序列变异的克孜河塔里木裂腹鱼和斑重唇鱼遗传多样性[J]. *动物学杂志*, 2009, 44(5): 8-13.
Yan X L, Yang J Q, Tang W Q, *et al.* Genetic diversity of two cyprinid fishes: *Schizothorax biddulphi* and *Diptychus maculatus* in Kezilesu River, Xinjiang uygur autonomous region based on *Cyt b* gene sequences variation[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(5): 8-13 (in Chinese).
- [20] 杨天燕, 张人铭, 郭焱, 等. 扁吻鱼和塔里木裂腹鱼线粒体 *COI* 基因片段的比较研究[J]. *水生态学杂志*, 2011, 32(1): 45-50.
Yang T Y, Zhang R M, Guo Y, *et al.* Comparative study on partial mitochondrial *COI* gene of *Aspiorhynchus laticeps* and *Schizothorax biddulphi*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(1): 45-50 (in Chinese).
- [21] 海萨·艾也力汗, 郭焱, 孟玮, 等. 基于线粒体控制区序列的塔里木裂腹鱼遗传多样性及种群分化分析[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 944-954.
Ayelhan H, Guo Y, Meng W, *et al.* Genetic diversity and population differentiation of *Schizothorax biddulphi* based on mtDNA control region sequences[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 944-954 (in Chinese).
- [22] 杨天燕, 孟玮, 郭焱, 等. 新疆两种裂腹鱼形态学和 *COI* 基因的比较分析[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(1): 10-14.
Yang T Y, Meng W, Guo Y, *et al.* Morphological and *COI* sequences analysis of two Schizothoracinae fishes in Xinjiang[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(1): 10-14 (in Chinese).
- [23] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415-426.
- [24] 根井正利. 分子群体遗传学与进化论 [M]. 王家玉, 译. 北京: 中国农业出版社, 1983: 169-201.
Nei M. *Molecular population genetics and evolution*[M]. Wang J Y, trans. Beijing: China Agriculture Press, 1983: 169-201 (in Chinese).
- [25] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R W. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins[J]. *Pacific Scientific*, 1982, 36(2): 141-157.
- [26] Su J H, Ji W H, Wei Y M, *et al.* Genetic structure and demographic history of the endangered and endemic schizothoracine fish *Gymnodiptychus pachycheilus* in Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Zoological Science*, 2014, 31(8): 515-522.
- [27] Su J H, Ji W H, Zhang Y P, *et al.* Genetic diversity and demographic history of the endangered and endemic fish (*Platypharodon extremus*): implications for stock enhancement in Qinghai Tibetan Plateau[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2015, 98(3): 763-774.

- [28] 樊自立, 徐海量, 张鹏, 等. 新疆车尔臣河及其水资源利用研究[J]. 干旱区研究, 2014, 31(1): 20-26.
Fan Z L, Xu H L, Zhang P, *et al.* The Qarqan River in Xinjiang and its water resources utilization[J]. Arid Zone Research, 2014, 31(1): 20-26 (in Chinese).
- [29] 常秋芳, 常宏. 罗布泊Ls2孔近7.1Ma以来沉积物的环境磁学研究[J]. 第四纪研究, 2013, 33(5): 876-888.
Chang Q F, Chang H. The environmental magnetism study of core Ls2 in Lop Nur, tarim since 7.1Ma[J]. Quaternary Sciences, 2013, 33(5): 876-888 (in Chinese).
- [30] 罗超, 彭子成, 杨东, 等. 新疆罗布泊地区的环境演化[J]. 自然杂志, 2006, 28(1): 37-41.
Luo C, Peng Z C, Yang D, *et al.* Research on the environmental evolution of Lop Nur in Xinjiang, China[J]. Chinese Journal of Nature, 2006, 28(1): 37-41 (in Chinese).
- [31] 袁国映, 袁磊. 罗布泊历史环境变化探讨[J]. 地理学报, 1998, 53(S1): 83-89.
Yuan G Y, Yuan L. An approach to the environmental changes in Lop-Nur history[J]. Acta Geographica Sinica, 1998, 53(S1): 83-89 (in Chinese).
- [32] 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[J]. 生物多样性, 2010, 18(3): 251-261.
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 (in Chinese).
- [33] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123(3): 585-595.
- [34] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9(3): 552-569.
- [35] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. 保育遗传学导论[M]. 黄宏文, 康明, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 126-137.
Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to conservation genetics[M]. Huang H W, Kang M, trans. Beijing: Science Press, 2005: 126-137 (in Chinese).
- [36] Okawa H, Okuda O, Arai H, *et al.* Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain[J]. Neuroreport, 2001, 12(18): 4003-4007.
- [37] 刘思情, 张家波, 唐琼英, 等. 基于ND4和ND5基因序列分析的鳅超科鱼类系统发育关系[J]. 动物学研究, 2010, 31(3): 221-229.
Liu S Q, Zhang J B, Tang Q Y, *et al.* Phylogenetic relationships among cobitoidea based on mitochondrial ND4 and ND5 gene sequences[J]. Zoological Research, 2010, 31(3): 221-229 (in Chinese).

Genetic diversity analysis of *Schizothorax biddulphi* based on mitochondrial DNA *COII* and *ND4* genes

REN Yongli, DAI Jincai, ZHAO Nianhua, ZHAO He, WEI Jie, NIE Zhulan*

(College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract: In order to explore the genetic diversity and genetic differentiation status of *Schizothorax biddulphi*, three different geographic populations of *S. biddulphi* in the Qarqan River, Kizil River, and Aksu Rivers were selected as the research objects. The mitochondrial DNA *COII* and *ND4* gene sequences of 126 samples were compared and analyzed, and the differences and relationships between the two kinds of markers on the genetic diversity analysis results of *S. biddulphi* were discussed. The results showed that the A + T contents of the mitochondrial DNA *COII* and *ND4* gene sequences of *S. biddulphi* were higher than the G + C contents, and the base composition was biased. Based on mitochondrial DNA *COII* and *ND4* gene sequence analysis, 6 and 23 haplotypes were identified in 126 samples. In the mitochondrial DNA *COII* gene sequence, there were shared haplotypes in the three populations. In the mitochondrial DNA *ND4* gene sequence, no shared haplotypes were found among the three populations. Based on the two kinds of markers, the haplotype diversity and nucleotide diversity of the three populations are $0.738 \pm 0.019 / 0.904 \pm 0.014$ and $0.02129 \pm 0.00298 / 0.04876 \pm 0.00149$, respectively. *S. biddulphi* is characterized by high haplotype polymorphism and high nucleotide polymorphism. The analysis of molecular variances (AMOVA) of the two kinds of markers showed that the genetic variation mainly came from the groups in all populations. Moreover, the genetic differentiation between the Qarqan River population and the other two populations reached a significant level ($P < 0.05$). The BI tree constructed by Bayesian method (BI) is consistent with the haplotype network diagram, and *S. biddulphi* formed two branches. The mismatch distribution of the *COII* and *ND4* gene sequences showed both bimodal pattern. This result indicates that the current distribution of *S. biddulphi* is the result of a second exchange between previously differentiated populations. The results also indicated that *S. biddulphi* had differentiated into 2 distinct geographic populations. In addition, when our research group studied the morphological difference analysis of different populations of *S. biddulphi*, it was found that the differentiation in some traditional morphological areas has reached the subspecies level. Therefore, it is suggested that the Qarqan River population should be managed as a separate population during the protection and development of germplasm resources.

Key words: *Schizothorax biddulphi*; genetic diversity; mitochondria DNA; *COII*; *ND4*

Corresponding author: NIE Zhulan. E-mail: niezh12004@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31560721, 31860729); Scientific and Technological Innovation Commanding Troops Talented Person Project Financially Supported by Xinjiang Production and Construction Corps for Young and Middle-aged (2018CB033); United Fund of the Ocean University of China and Tarim University (ZHYLH201902); Innovative Research Team Project of President's Fund of Tarim University (TDZKCX202204); Research Cooperation Joint Fund Project by Huazhong Agricultural University and Tarim University (TDHNLH201702, 2662017PY118)