

文章编号: 1674 - 5566(2012)03 - 0337 - 07

珠江和长江水系赤眼鳟 D-loop 基因序列遗传变异分析

杨慧荣¹, 赵会宏^{1,2}, 刘丽¹, 陈彦珍¹, 林权卓¹, 黄宏辉³

(1. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2. 广东海洋大学 南海水产经济动物增殖养殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524088; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部渔业生态环境重点开放实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 利用 PCR 技术扩增得到珠江和长江水系共 29 个赤眼鳟 (*Squaliobarbus curriculus*) 线粒体 DNA D-loop 基因片段, 并测定其序列。对 599 bp 的 D-loop 基因序列进行分析, 共检测到 24 个单倍型, 25 个单突变位点, 39 个简约信息位点。在 81 个突变位点中, 转换位点 50 个, 颠换位点 14 个, 插入或缺失位点 17 个; A + T 的含量 (68.8%) 明显高于 C + G 的含量 (31.2%)。5 个水域个体间的遗传变异率在 0 到 6.03% 之间。单倍型多样性 (H) 为 0.977 8, 平均核苷酸差异数 ($K \pm SD$) 为 17.271 0, 核苷酸多样性 (π) 为 0.029 7。对 5 个群体 D-loop 序列进行分化指数分析, 结果表明: 不同水系群体间有显著的遗传差异, 而同一水系内的不同群体间差异不显著。对 5 个群体进行分子方差分析, 结果表明: 5 个群体间存在显著性遗传差异。分子系统树显示: 两大水系 5 个不同水域赤眼鳟 29 个个体的系统树明显分为两支: 珠江 15 个个体聚为一支, 长江 14 个个体聚为另一支, 且都有较高的置信度。可见, 长江和珠江群体间已经出现了明显的遗传变异, 是因珠江和长江的地理隔离导致的生殖隔离。但在同一水系内, 群体间的遗传距离和群体内的遗传差异不显著, 系统树也是两大水系内的不同水域混杂在一起, 说明同一水系不同水域间没有出现遗传分化, 分属“长江群体”或“珠江群体”。

研究亮点: 首次应用线粒体 D-loop 技术对长江和珠江水系 5 个水域赤眼鳟群体进行遗传多样性分析及其遗传分化探讨。结果发现: 赤眼鳟相对其他物种, 表现出较高的遗传多样性水平。同时, 因珠江和长江的地理隔离导致的生殖隔离, 长江和珠江水系群体间已经出现了明显的遗传分化, 首次提出了赤眼鳟“长江群体”或“珠江群体”的概念。
关键词: 赤眼鳟; 线粒体; D-loop; 遗传变异; 珠江; 长江
中图分类号: S 917
文献标志码: A

赤眼鳟 (*Squaliobarbus curriculus*) 属鲤科 (Cyprinidae), 雅罗鱼亚科 (Leuciscinae), 赤眼鳟属 (*Squaliobarbus*), 俗称红眼棒、野草鱼、参鱼, 是广布中国主要水系的野生经济鱼类^[1]。赤眼鳟因其肉质细嫩, 味道鲜美, 抗病力强, 食性杂, 生长较快等特点, 成为我国重要的经济鱼类之一。但是由于长期以来对渔业资源的不合理利用, 特别是近年来水环境遭受严重污染, 导致野生赤眼鳟资源衰竭, 种质严重退化。

鱼类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 分子小, 结构简单, 进化速度快, 不同区域进化速度存在明显差异^[2-3]。在 mtDNA 上, 位

于 tRNA^{Pro} 和 tRNA^{Phe} 基因之间的 D 控制区 (D-loop) 是整个 mtDNA 上序列和长度变异最大的区域^[1], 也是线粒体基因中进化最快的部分, 一般用来进行种内群体间的遗传多态性水平和遗传分化研究^[2-5]。

早期国内仅有关于赤眼鳟资源状况、生物学、养殖和人工繁殖的报道和对其生长和生活史的研究^[6-7], 仅杨太有等^[8-9]用 RAPD 和 ISSR 技术对丹江口水库、青龙湖和宿鸭湖 3 地理群体遗传多样性的分析。本研究开展了珠江水系和长江水系不同水域赤眼鳟 mtDNA D-loop 基因序列的比较分析, 旨在查明赤眼鳟的遗传多样性状况

收稿日期: 2011-11-17 修回日期: 2012-02-16

基金项目: 农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金(2004-9); 南海水产经济动物增殖养殖广东普通高校重点实验室开放基金(GDOU201102); 广东省水利科技创新项目(GOSL2011008); 广东省科技计划项目(2007B020708012)

作者简介: 杨慧荣(1977—), 女, 讲师, 在职博士, 研究方向为渔业种质资源、鱼类生理与分子生物学。E-mail: hry@scau.edu.cn

和群体遗传结构,分析其遗传变异,为该物种多样性保护提供必要的遗传背景资料和数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

赤眼鳟样品于 2005 年 6 月分别采自长江水系的宜昌和武汉江段(编号为 YC 群体、WH 群体),YC 群体取自宜昌巴东县的官渡口,属于长江上游干流巫峡的起点,WH 群体取自武汉市境内江段,属于长江中游水域。珠江水系的梧州、三水、新丰江段(编号分别为 WZ、SS、XF),分别代表了珠江水系的西江、北江和东江流域,共计 29 个个体。活体运回实验室后取背部肌肉并置于超低温冰箱,取样后的赤眼鳟用福尔马林固定保存。

1.2 方法

基因组 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》^[10]的方法略加改进。PCR 反应在 Biometra PCR 仪上进行。D-loop 引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成,序列为 DL1:5'-ACCCCTGGCTCCCAAAGC-3',DH2:5'-ATCTTAGCATCTTCAGTG-3'^[11]。反应总体积为 50 μL ,其中 10 \times Taq Buffer 5 μL ,Taq Polymerase 0.5 μL (5 U/ μL),dNTPs (A、T、C、G 各 2.5 mmol/L)4 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L)2.5 μL ,引物 1 和 2 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL ,模板 DNA 50 ng,无离子超纯水 35.5 μL 。扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后,再进行 35 个循环,每一循环包括:94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。扩增产物经 1.5% TBE 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,紫外灯光下检测、拍照。

1.3 测序与数据分析

产物纯化和序列测定由上海基康公司完成。用 CLUSTAL-X 程序对所获得的序列进行比对^[12],采用软件 DAMBE 统计单倍型并作图,检测转换、颠换是否达饱和。群体的遗传多样性指标单倍型多样性(haplotype diversity, H)和核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)由 ARLEQUIN 统计软件^[13]计算获得,群体间的分化指数(F -statistics, F_{ST})^[14]的计算在 ARLEQUIN 中完成,群体间的基因流^[15]由公式 $N_m = (1/F_{ST} - 1)/2$ 计算得出,群体遗传变异的分子方差分析

(AMOVA)^[16]在 ARLEQUIN 中完成。采用 Mega 4.1 软件^[17]统计 DNA 序列的碱基组成,转换/颠换、插入/缺失位点数,单突变位点,简约信息位点和平均转换/颠换率;计算个体间、群体内和群体间的遗传变异率;用 NJ 法进行聚类分析,构建聚类关系树。

2 结果

2.1 D-loop 基因序列的信息及变异情况

由软件 DAMBE 统计可知:在 29 个个体中共检测出 24 个单倍型,由转换、颠换对遗传距离图(图 1)可知:转换和颠换数没有达到平台效应,即没有达到饱和状态,说明供统计分析的数据准确可靠。

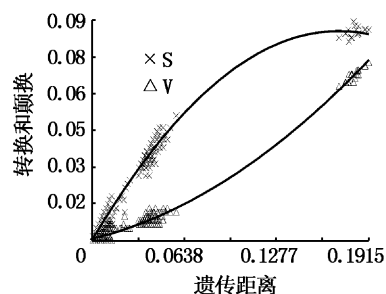


图 1 转换、颠换对遗传距离图

Fig. 1 The graph for transition and transversion versus divergence

由 Mega 4.1 软件对 599 bp 的 D-loop 基因序列进行分析,检测到 25 个单突变位点,39 个简约信息位点数;在 81 个突变位点中:转换位点 50 个,颠换位点 14 个,插入/缺失位点 17 个,转换明显高于颠换,平均的转换发生频率是颠换的 3.478 倍。由软件 Mega 4.1 统计可知:29 个个体 D-loop 基因片段中 T、C、A、G 碱基平均含量分别为 35.1%,17.5%,33.7%,13.7%,其中,A + T 的含量(68.8%)明显高于 C + G 的含量(31.2%)。

2.2 D-loop 基因序列的遗传变异分析

用软件 Mega 4.1 统计出两水系 5 个不同水域赤眼鳟各个体间的转换/颠换数及遗传变异率。在检测的 599 bp 的序列中,各个体间的转换位点为 0-27,颠换位点为 0-8,均为转换大于颠换。两大水系 5 个不同群体个体间的遗传变异率在 0~6.03% 之间,而赤眼鳟不同个体与青鱼的遗传变异率在 17.86%~19.75% 之间。5 个不

同群体赤眼鳟(SS、WZ、XF、YC、WH)群体内的遗传距离分别是 0.009 8、0.010 9、0.011 7、0.005 3、0.009 5, 群体间的遗传距离值为 0.007 6~0.048 1, 总平均遗传距离为 0.029 2 (不含外群,表 1)。

表 1 两大水系 5 个不同水域赤眼鳟群体内、群体间以及总平均遗传距离

Tab.1 The intrapopulation and interpopulation genetic distances, overall mean genetic distances of *S. curriculus* from five different water areas in Yangtze River and Pearl River

遗传距离	三水	梧州	新丰	宜昌	武汉
三水	0.009 8				
梧州	0.011 3	0.010 9			
新丰	0.013 8	0.011 0	0.011 7		
宜昌	0.046 2	0.045 1	0.042 5	0.005 3	
武汉	0.048 1	0.047 0	0.044 5	0.007 6	0.009 5
总平均遗传距离	0.029 2(不含外群)				

5 个群体的 D-loop 序列的单倍型多样性 (H)、平均核苷酸差异数 ($K \pm SD$)、核苷酸多样性 (π) 见表 2。5 个群体间的 F_{ST} 及 N_m 值见表 3。从表 3 可以看出: 武汉群体与三水群体、新丰群体及梧州群体的遗传差异显著, 宜昌群体与三水

群体、新丰群体及梧州群体的遗传差异显著, 而同一水系内的不同群体差异不显著。把 5 个群体作为一个组进行群体间的分子变异等级分析 (AMOVA, 表 4), 结果表, 群体间存在显著性遗传差异 ($F_{ST} = 0.679 62, P = 0 < 0.05$)。

表 2 5 个赤眼鳟群体各种多样性指标

Tab.2 Indexes of genetic diversity in the five populations of *S. curriculus*

群体	样品数(n)	单倍型多样性(H)	平均核苷酸差异数 ($K \pm SD$)	核苷酸多样性 (π)
宜昌	7	0.952 4 \pm 0.095 5	3.904 8 \pm 2.224 8	0.006 7 \pm 0.004 4
武汉	7	1.000 0 \pm 0.076 4	6.000 0 \pm 3.255 3	0.010 3 \pm 0.006 4
三水	5	0.700 0 \pm 0.218 4	6.600 0 \pm 3.755 2	0.011 3 \pm 0.007 5
新丰	5	1.000 0 \pm 0.126 5	8.000 0 \pm 4.483 0	0.013 7 \pm 0.009 0
梧州	5	1.000 0 \pm 0.126 5	6.800 0 \pm 3.859 2	0.011 6 \pm 0.007 7
总计	29	0.977 8 \pm 0.017 3	17.270 9 \pm 7.905 8	0.029 7 \pm 0.015 1

表 3 群体间的 N_m (对角线上方) 和 F_{ST} (对角线下方)

Tab.3 Population pairwise N_m (above diagonal) and F_{ST} (below diagonal) values

群体	武汉	宜昌	三水	新丰	梧州
武汉		16.964 20	0.117 94	0.147 09	0.121 40
宜昌	0.028 63 ^{n.s.}		0.152 44	0.184 48	0.156 54
三水	0.809 14*	0.766 35*		2.005 51	7.282 10
新丰	0.772 69*	0.730 48*	0.199 56 ^{n.s.}		46.228 97
梧州	0.804 64*	0.761 57*	0.064 25 ^{n.s.}	0.010 70 ^{n.s.}	

注: * 表示 $P < 0.05$; n. s 表示无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 4 群体间的遗传变异的分子变异等级分析 (AMOVA)

Tab.4 Analysis of molecular variance (AMOVA)

组别	自由度	遗传变异元素	占总变异百分比	总变异百分比	F -统计量	P 值
组别	4	166.959	6.699 75	67.96	0.679 62	0.000 0*
群体内	24	75.800	3.158 33	30.84		
总体	28	242.759	9.858 08			

注: * 表示 $P < 0.05$; n. s 表示无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 分子系统树

以青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) D-loop 基因序列为外群,用 Mega 4.1 中的 NJ 法构建分子系统树,其拓扑结构见图 2。用 Bootstrap 1 000 给出各支的置信度,最高为 100,最低为 15。两大水系 5 个不同水域赤眼鳟 29 个个体的系统树明显分为两支:珠江 15 个个体聚为一支,长江 14 个个体聚为另一支,且都有较高的置信度,各大水系内的不同水域个体却混杂在一起。

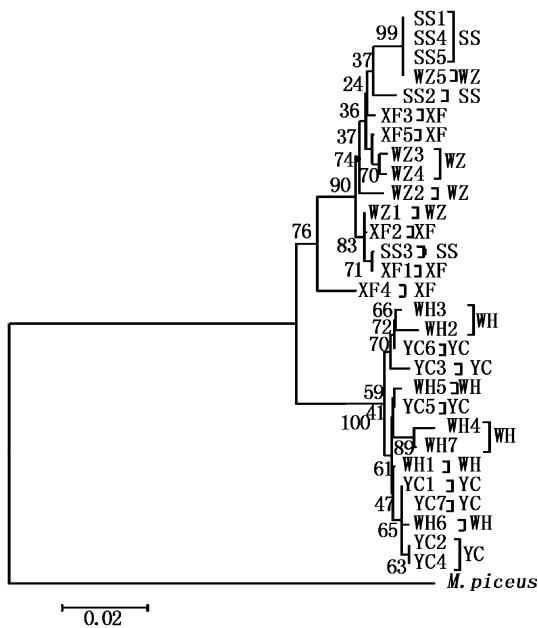


图 2 两大水系 5 个不同水域赤眼鳟 D-loop 基因序列的 NJ 分子系统树

Fig. 2 The molecular phylogenetic tree of *S. curriculus* from five water areas in Yangtze River and Pearl River by NJ method

数值表示 1 000 次重复抽样的百分比。

3 讨论

在所研究的不同水域赤眼鳟个体 D-loop 基因片段中检测出了 81 个变异位点,其中既有插入/缺失位点,也有转换、颠换位点,再一次验证了 D-loop 基因序列的高进化速率。在 Cyt b 中很少会发现插入/缺失位点^[18-19],主要是由于 Cyt b 用于编码蛋白质,如有插入/缺失的发生很容易被淘汰;而 D-loop 片段为非编码基因,主要与线粒体基因的调控有关,不受蛋白功能上的需要和三联体密码的限制,所以插入/缺失突变后比较容易被保留。在检测的 599 bp 的序列中,各个体间的转换位点为 0-27,颠换位点为 0-8,每条序

列的转换均大于颠换,GERLACH 和 MUSOLF^[20]的研究成果也证实了该观点,其原因仍不清楚,需要进一步研究。

本研究采用了单倍型多样性 (H)、平均核苷酸差异数 ($K \pm SD$) 和核苷酸多样性 (π) 来评价赤眼鳟的遗传多样性,分别为 0.977 8、17.271 0 和 0.029 7,与相同技术对光唇裂腹鱼^[21]、铜鱼^[22]和东海银鲳^[23]的研究结果相比,长江和珠江水系的赤眼鳟表现出较高的遗传多样性水平,且单倍型的检出率也远远高出其他物种。虽然由于鱼类的分类地位、生态习性及其淡、海水鱼类在基因交流方面的不同,可能导致它们彼此之间在遗传分化水平上存在差异,但上述比较,在一定程度上能够间接反映出赤眼鳟的遗传多样性状况。从遗传变异率来看,5 个不同水域个体间的遗传变异率在 0~6.03% 之间,研究表明,淡水鱼同种个体间线粒体遗传变异的峰值水平是 10%^[24]。本研究个体遗传变异范围均在这个峰值之内,且明显小于赤眼鳟与外群青鱼间的遗传变异率 (17.86%~19.75%)。

5 个不同水域赤眼鳟群体内、群体间的遗传距离表明:长江水系和珠江水系间的遗传距离明显大于同一水系内不同水域间的遗传距离;对 5 个群体 D-loop 序列进行 F_{ST} 分析,显示不同水系赤眼鳟群体间有显著的遗传差异;对 5 个群体进行 AMOVA 分析,结果表明:5 个群体间存在显著性遗传差异。可见,长江和珠江群体间已经出现了明显的遗传分化,分子系统树也支持了上述观点。两大水系 5 个不同水域赤眼鳟 29 个个体的系统树明显分为两支:珠江 15 个个体聚为一支,长江 14 个个体聚为另一支,且都有较高的置信度。分析其原因:主要因为珠江和长江的地理隔离导致的生殖隔离。不同水系的赤眼鳟群体其繁殖季节有明显的区别,长江群体为 5 月初至 6 月初,珠江群体为 3 月中旬至 5 月初,从生殖习性来看,他们都有各自的繁殖季节和产卵区域;从地理位置和气候来看,南北气候相差较大,长江属温带季风气候,珠江属热带海洋性气候,它们在地理条件、生态环境和繁殖习性上的较大差异直接导致了地理隔离和生殖隔离,也未有跨水系的引种记录,故几乎不存在种群间基因交流的可能,所以在不同水系形成遗传性能上互有差异的孟德尔繁育群体,两者明显属于相互独立的不同的

地理群体。

但是,在同一水系内,群体间的遗传距离和群体内的遗传距离相差不大,且对 5 个群体 D-loop 序列进行 F_{ST} 分析,显示同一水系内的不同群体间遗传差异不显著;系统树也是两大水系内的不同水域混杂在一起。从地理位置上看,珠江水系的 3 个采样点分别代表了西江、北江和东江流域,长江流域的 2 个采样点分属长江上游和中游,且有三峡大坝相隔,可是研究结果表明:同一水系不同水域间没有出现遗传分化,分属“长江群体”和“珠江群体”。

分析其原因,主要与赤眼鳟的半洄游习性有关。一般来说,相同条件下定居性鱼类群体间的遗传分化和遗传变异比洄游性鱼类高。例如鲤是定居型鱼类,它能在湖泊中完成整个生活史,尽管过去长江流域经常发生洪涝灾害,导致群体间高度基因交流,但研究结果仍然表明长江流域的 3 个鲤群体存在明显的遗传分化^[25]。鲤形目(Cypriniformes) 鮡亚科(Gobioninae)的圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)和铜鱼(*Coreius heterodon*)^[26],同属洄游型鱼类,无论是在 mtDNA 序列还是基于微卫星数据分析,其长江水系各群体间的遗传距离都很小,所有群体间都没有显著性的遗传分化。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)作为半洄游性的四大家鱼之一,根据线粒体 DNA 和微卫星 DNA 研究结果^[27-29]表明:长江水系的草鱼没有遗传分化,即只有一个“长江群体”。赤眼鳟属于江湖半洄游型鱼类,在江河流水中产漂流性卵,随流水漂流孵化,鱼卵和初孵仔鱼在漂流过程中发育^[1, 30-31]。杨太有等^[8-9]对宿鸭湖、青龙湖和丹江口水库 3 个赤眼鳟群体的遗传多样性分析结果也显示:3 地理群体间遗传分化差异并不明显,与本研究结果相似。另外,赤眼鳟鱼苗的放流^[32-33]和人工养殖逃逸造成的基因交流也不容忽视。

参考文献:

- [1] 杨干荣,黄宏金. 雅罗鱼亚科[M]//伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海:上海科学技术出版社,1982:52-53.
- [2] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展[J]. 遗传学报,2004,31(9):983-1000.
- [3] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-391.
- [4] LEE W J, KOCHER T D. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization [J]. *Genetics*, 1996, 139: 873-887.
- [5] 葛陇利,赫崇波,高祥刚,等. 利用 mtDNA 控制区序列分析斑点叉尾鲷的遗传多样性[J]. 水产科学,2007,26(10):547-550.
- [6] 李桂峰,康裕财,孙际佳,等. 酵母多糖对赤眼鳟非特异性免疫技能的影响[J]. 中山大学学报:自然科学版,2003,42(4):55-58.
- [7] 何学福,阳清发. 嘉陵江西河赤眼鳟的生长研究[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,1997,22(6):680-685.
- [8] 杨太有,关建议,陈宏喜. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水生生物学报,2008,32(4):529-533.
- [9] 杨太有,关建议,陈宏喜,等. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 四川动物,2008,27(5):783-784.
- [10] SAMBROOK J, RUSSELL D. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社,1996:464-469.
- [11] 唐琼英,刘焕章,杨秀平,等. 沙鳅亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究[J]. 水生生物学报,2005,29(6):645-653.
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC 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.
- [13] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis[M]. Switzerland: Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, 2000.
- [14] WRIGHT S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating [J]. *Evolution*, 1965, 19: 395-420.
- [15] NEI M. Evolution of human races at the gene level [M]//BONNE T B, COHEN T, GOODMAN R M, et al. *Human Genetics, Part A: The unfolding genome*. New York: Alan R Liss, 1982: 167-181.
- [16] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479-497.
- [17] KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN I B, et al. MEGA 2.0: molecular evolutionary genetics analysis software [M]. Tempe: Arizona State University, 2001.
- [18] 唐琼英,杨秀平,刘焕章. 刺鲃基于线粒体细胞色素 b 基因的生物地理学过程[J]. 水生生物学报,2003,27(4):352-356.
- [19] BILLINGTON N, HEBERT P D. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(s1):

- 80-94.
- [20] GERLACH G, MUSOLF K F. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles [J]. *Conservation Biology*, 2000, 14: 1066-1074.
- [21] 韩虎峰, 代应贵. 珠江水系光唇裂腹鱼可渡河种群 mtDNA D-loop 序列多态性分析 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 143-149.
- [22] 袁娟, 张其中, 李飞, 等. 铜鱼线粒体控制区的序列变异和遗传多样性 [J]. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 9-19.
- [23] 彭士明, 施兆鸿, 陈超, 等. 根据 mtDNA D-loop 序列分析东海银鲳群体遗传多样性 [J]. *海洋科学*, 2010, 34(2): 28-32.
- [24] MOMMSEN T P, HOCHACHKA P. *Biochemistry and molecular biology of fishes* [M]. London: Elsevier Science Publishers, 1993: 1-38.
- [25] TONG J, YU X, LIAO X. Characterization of a highly conserved microsatellite marker with utility potentials in cyprinid fishes [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2005, 21: 232-235.
- [26] LIAO X L, ZHU B, YU X M, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, brass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(2): 393-395.
- [27] 李思发, 吕国庆, 贝纳切兹. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析 [J]. *动物学*, 1998, 44(1): 82-93.
- [28] 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 [J]. *水生生物学*, 2002, 26(2): 142-147.
- [29] LU G, LI S, BERNATCHEZ L. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and Conserve Gene of four native carps within the Yangtze River, China [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatical Sciences*, 1997, 54: 47-58.
- [30] 陆奎贤. 珠江水系渔业资源 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 139.
- [31] 李捷, 李新辉, 谭细畅, 等. 广东肇庆西江珍稀鱼类省级自然保护区鱼类多样性 [J]. *湖泊科学*, 2009, 21(4): 556-562.
- [32] 崔树彬, 王现方, 邓家泉. 试论珠江水系的河流生态问题及对策 [J]. *水利发展研究*, 2005(9): 7-11.
- [33] 胡廷尖, 茅树杰. 浅析国内赤眼鳟研发现状 [J]. *河北渔业*, 2006(4): 7.

Assessing genetic diversity of mitochondrial D-loop sequences of *Squaliobarbus curriculus* in Yangtze River and Pearl River

YANG Hui-rong¹, ZHAO Hui-hong^{1,2}, LIU Li¹, CHEN Yan-zhen¹, LIN Quan-zhuo¹, HUANG Hong-hui³

(1. Animal Science College, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China; 2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 3. Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, Guangdong, China)

Abstract: 29 mitochondrial D-loop gene segments of *Squaliobarbus curriculus* from Yangtze River and Pearl River were amplified with PCR technique and sequenced. Analysis on D-loop of 599 bp showed that there were 24 unique sequences, 25 singleton, 39 parsim-info, 81 mutation sites in all, including 50 transition sites, 14 transversion sites and 17 insert/lacuna sites. The content of A + T (68.8%) was much more than that of C + G (31.2%). The genetic diversities among the 5 water areas ranged from 0 to 6.03%. Haplotype diversity (H) was 0.977 8, mean number of pairwise differences ($K \pm SD$) was 17.271 0, nucleotide diversity (π) was 0.029 7. F_{ST} values between WH and SS, XF, WZ populations, between YC and SS, XF, WZ populations showed significant genetic differences, and the one among all the other populations showed no strong genetic differences. Significant genetic differentiation among all five populations was found by analysis of molecular variance (AMOVA). According to the molecular phylogenetic tree constructed by NJ methods based on D-loop, the individuals of Yangtze River and Pearl River assembled in two branches respectively with high confidence. The obvious genetic differentiation was mainly attributed to the reproductive isolation caused by the geographical isolation between Yangtze River and Pearl River. But, for Yangtze River, the molecular phylogenetic tree was immingled because the intrapopulation and interpopulation genetic distances differed little. So it showed that there was no genetic differentiation in those from different water areas, which belonged to 'Yangtze population'. It was also the case with 'Pearl population'.

Key words: *Squaliobarbus curriculus*; mitochondria; D-loop; genetic diversity; Yangtze River; Pearl River