

淮河野生鲇鱼线粒体 Cyt *b* 基因的序列变异与遗传结构分析

肖明松 崔峰 康健 张晓红

安徽科技学院生命科学学院 凤阳 233100

摘要: 本研究利用线粒体 DNA 细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列分析淮河信阳段、淮滨段、蚌埠段、洪泽湖及其支流颍河、淝河和池河的野生鲇鱼 (*Silurus asotus*) 种群遗传结构及种群历史。结果表明,在 841 bp 的同源序列中,7 个种群共检测到变异位点 40 个,占全部序列的 4.76%,121 个个体共检测到 32 种单倍型;7 个种群的平均单倍型多样性 (h)、核苷酸多样性 (P_i) 分别为 0.884 8、0.003 8,表明淮河野生鲇鱼种群的遗传多样性水平较高。7 个种群间的遗传分化指数 F_{st} 为 0.115 0,仅 12.92% 的变异来自种群间 (AMOVA 分析),基因交流值为 3.85,种群间 K2-P 遗传距离为 0.002 ~ 0.009,显示鲇鱼种群间没有发生明显的地理分化。NJ 树揭示 7 个种群的个体组成 2 个谱系,但这 2 个谱系与地理分布并不相关。中性检验、错配分析和 Network 网络亲缘关系分析皆表明鲇鱼种群有过种群扩张,扩张时间约在 0.17 ~ 0.29 百万年前的中更新世中期和末期。

关键词: 鲇鱼;线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因;种群遗传结构;种群扩张

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2013)01-75-12

Genetic Structure and Variation of Wild Chinese Catfish from Huaihe River Based on Cytochrome *b* Gene Sequences

XIAO Ming-Song CUI Feng KANG Jian ZHANG Xiao-Hong

College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

Abstract: The Chinese Catfish *Silurus asotus* is a commercially valuable aquaculture fish in some regions of China and Japan, and it is widely distributed throughout the freshwater reservoirs, lakes and rivers of China. Due to overfishing, environmental pollution, water conservancy, human production activities and other causes, wild Chinese Catfish has declined rapidly. Its fishery resource has been gradually exhausted in the Huaihe River Basin in the past decades. In order to analyze the genetic structure and demographic history of *S. asotus*, the mitochondrial cytochrome *b* (Cyt *b*) gene sequences were used in the study. The results showed that Cyt *b* gene sequence contained 841 bp nucleotides and the T, C, A and G contents were 28.59%, 29.55%, 27.44% and 14.42%, respectively. A total of 40 nucleotide sites and 32 haplotypes were obtained from 121 individuals collected in 7 different regions, including Xinyang, Huaibin, Bengbu, Hongze Lake, Yinghe River, Pihe River and Chihe River. The average haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (P_i) were 0.884 8, 0.003 8,

基金项目 安徽省教育厅重点科研项目 (No. KJ2011Z069), 安徽科技学院稳定人才项目 (No. ZRC2011257), 安徽科技学院预研项目 (No. ZRC2012312);

第一作者简介 肖明松,男,博士;研究方向:渔业生态和分子进化;E-mail: xiaomingsong2004@126.com。

收稿日期:2012-07-15,修回日期:2012-10-12

respectively, showing that there was a high level genetic diversity in the populations of *S. asotus* from Huaihe River basin. The AMOVA analysis (total $F_{st} = 0.1150$) and the level of N_m values (3.58), as well as the average K2-P distances (0.002 – 0.009) all revealed that the *S. asotus* had no obviously geographical differentiation. However, the phylogenetic tree estimated by neighbor-joining (NJ) method indicated that the individuals of *S. asotus* formed two monophyletic lineages, and the two lineages were not correlated with geographical populations. Neutrality tests, mismatch distribution and network analysis suggested that this species underwent population expansion in the middle and late phase of middle Pleistocene following bottlenecks and/or they originated from a small number of founding individuals. The time that the total population of *S. asotus* expanded in the Huaihe River was estimated to be 0.17 – 0.29 million years ago.

Key words: *Silurus asotus*; mtDNA Cyt *b*; Population genetic structure; Population expansion

鲇鱼(*Silurus asotus*)隶属硬骨鱼纲鲇形目鲇科鲇属。俗称鲇鱼、河鲇、鲇拐子、泥鱼等,为我国鲇形目分布最广且产量较高的重要淡水经济鱼类(褚新洛等 1999)。在我国广泛分布于黑龙江、辽河、黄河、淮河、长江、珠江等水域和台湾省,其中以长江、钱塘江流域为多。鲇鱼个体较大、生长较快、肉质细嫩鲜美,属高蛋白低脂肪的食品,深受消费者欢迎(陈湘舜 1977,褚新洛等 1999)。近年来由于淮河流域环境污染日益恶化、水利工程和人类生产活动对自然资源的无节制掠夺已经对淮河流域的渔业资源造成了难以逆转的破坏,鲇鱼资源已逐渐枯竭(胡贤江等 2002,阎伍玖等 2004)。因此,在大力保护环境、控制疾病泛滥的同时,保护鲇鱼种质资源的合理利用和可持续发展就显得尤为重要了。合理利用鱼类遗传资源,深入了解鲇鱼的亲缘关系和遗传多样性的现状,有利于种质资源的恢复、保护及遗传改良,控制养殖品种的交叉引进,规范水产健康养殖的法规。

鱼类线粒体 DNA 具有分子小、结构简单、母系遗传、进化速度快、几乎不发生重组、不同区域进化速度存在差异等特点,通常能够全面反映种群内和种群间的遗传变异(Bermingham et al. 1986, Oleinik et al. 2007, Teletchea 2009)。细胞色素 *b*(Cyt *b*)基因是线粒体 DNA 上结构和功能被了解得较为清楚的蛋白质基因,且进化速度适中。近年来,多基于 Cyt *b* 基因序列研究鱼类的种群遗传多样性和系统发生关系(Bennetts et al. 1999, Perdices et al. 2005, 刘宏毅等 2011)。目前,对鲇鱼的生物学、生理

学、遗传学等方面进行了研究(陈湘舜 1977, 陈定福等 1990, 魏刚等 1997, 褚新洛等 1999, 耿德贵等 1999, Wen et al. 2003),关于其遗传多样性的研究仅见李学英等(2001)、王庆容等(2008, 2009)的报道。本研究以不同地理来源的淮河鲇鱼为研究对象,利用线粒体细胞色素 *b* 基因序列展开不同采样点鲇鱼种群遗传结构分析研究,以期获得淮河野生鲇鱼种群遗传变异情况,并为淮河野生鲇鱼种群的划分及保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 7 个野生鲇鱼种群样品于 2010 年 3 月至 2011 年 10 月间分别采自淮河的信阳段(Xinyang, XY)(17 尾)、淮滨段(Huabbin, HB)(17 尾)、蚌埠段(Bengbu, BB)(21 尾)、洪泽湖(Hongze Lake, HZL)(18 尾)、淮河支流的颍河(阜阳 Fuyang, FY)(17 尾)、淮河支流的淝河(六安 Liu'an, LA)(17 尾)、淮河支流的池河(明光 Mingguang, MG)(14 尾),共 121 尾,体长 20.0 ~ 68.2 cm,体重 52.6 ~ 564.5 g。采样地点被分为假定的两个组:淮河上游(信阳、淮滨、颍河和淝河),淮河中游(蚌埠、池河和洪泽湖),具体采样地点和采样数量见图 1。标本采用 95% 乙醇固定, -20℃ 保存在安徽科技学院。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备 每个样品随机取肌肉 100 ~ 200 mg,剪碎,匀浆后置于 1.5 ml 的微量离心管中,加入含蛋白酶 K 的裂解液(10

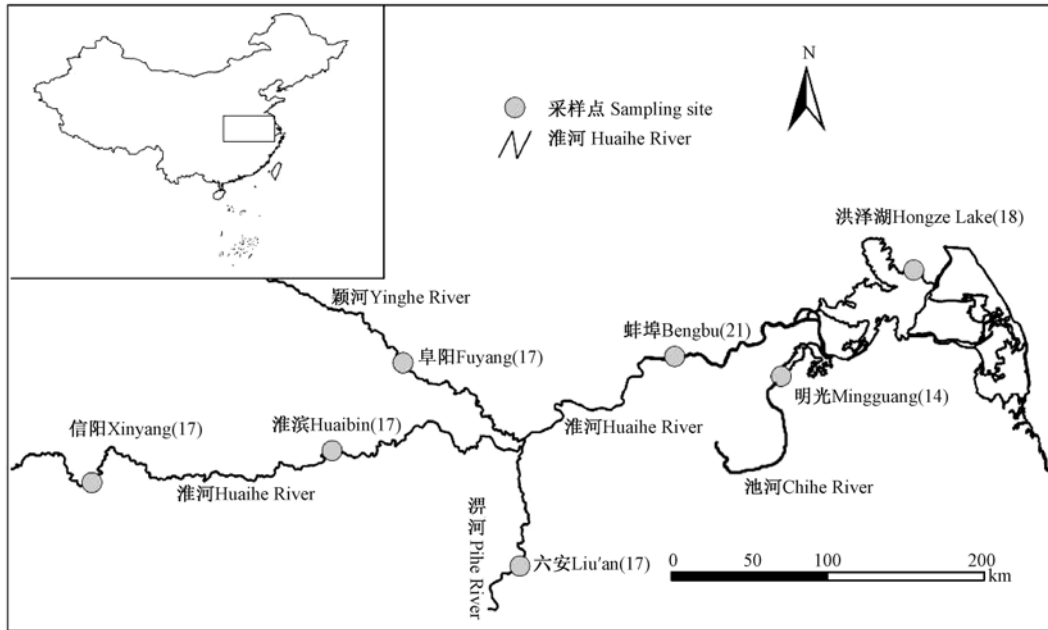


图 1 淮河鲇鱼采样图

Fig. 1 Sampling localities of *Silurus asotus* from Huaihe River in this study

括号内的数字为此采样点所采集的样本数。

The numbers in parentheses are sample sizes for sampling localities.

mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% SDS), 55℃ 消化过夜。次日分别用 Tris 饱和酚、氯仿/异戊醇 (24:1) 提取、纯化 DNA, 之后用 -20℃ 冷冻的无水乙醇沉淀 DNA, 自然干燥后, 溶于灭菌双蒸水中。基因组 DNA 样品用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 同时用琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性并估测分子量。基因组 DNA 样品置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 反应 用于 Cyt b 基因片段扩增的两条引物为 L14724 (5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TG-3') 和 H15915 (5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3') (Xiao et al. 2001), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 30 μl, 其中含 10 × buffer 反应缓冲液 3.0 μl, 3 μl dNTP (2.5 mmol/L), 0.4 μmol/L 引物, 0.25 μl Taq 酶 (5 U/μl) (大连 TaKaRa 公司), 25 ng DNA, 用灭菌双蒸馏水补足体积。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个

循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。由于部分个体仅获得 841 bp 的准确片段, 为了使用所有样本的数据用于分析, 所以统一采用 841 bp 的片段用于遗传多样性分析。

1.2.3 DNA 序列测定和分析 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将 PCR 产物送往上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定, 测得的序列用 Clustal X 程序 (Thompson et al. 1997) 进行比对, 并辅以人工校对, 进行同源性比较。所有序列均递交 GenBank (登录号为 JX042026 ~ JX042057)。利用 MEGA 3.0 软件包 (Kumar et al. 2004) 分析序列特征, 统计碱基组成和转换与颠换值, 计算遗传差异和遗传距离。以兰州鲇 (*S. lanzhouensis*) (GenBank 登录号: HQ890503.1) 和南方鲇 (*S. meridionalis*) (GenBank 登录号: AF416892.1) 作为外群, 应用 MEGA 3.0 中 Kimura-2-parameter 模型构建单倍型邻接 (neighbor-joining, NJ) 树, NJ 树采用自展法 (bootstrap) 进行 1 000 次重复分析检验置信度, 大于 50% 的 bootstrap 标注在图上。利

用 DnaSP 4.0 软件 (Rozas et al. 2003) 计算各种群的单倍型多样性 (h)、平均核苷酸差异数 (K)、核苷酸多态性 (P_i), 绘制单倍型歧点分布。用 Arlequin 3.0 软件 (Excoffier et al. 2005) 进行中性检验, 以检验淮河鲇鱼序列是否符合中性变异, 计算 Tajima's D 值和 Fu's F 值, 评估淮河鲇鱼种群历史, 并利用 Rogers 等 (1992) 的公式 $\tau = 2ut$ 进行种群扩张时间 t 值估算, 式中, τ 是错配分布的模型, 可由 Arlequin3.0 软件分析获得, u 值是指所有单倍型的变异率, u 值可以通过公式 $u = 2\mu k$ 计算获得, μ 值是指核苷酸的变异率, k 值是指所分析核苷酸片段的长度, 最终的大致扩张年代还要再乘以鲇鱼的性成熟年龄。用分子变异分析法 (analysis of molecular variance, AMOVA) 分析种群间遗传分化指数 F_{st} , 并用排列测验法 (permutation test) 检测其显著性, 并根据 $N_m \approx (1 - F_{st}) / (2F_{st})$ 得到种群间的基因流值 (N_m)。为进行谱系生物地理学 (phylogeography) 分析, 利用 Bandelt 等 (1999) 的 Network 4107 软件构建单倍型的网状图。

2 结果与分析

2.1 鲇鱼线粒体细胞色素 b 基因序列变异

利用引物 L14724 和 H15915 从所有鲇鱼个体的总 DNA 中均成功扩增出 841 bp 的线粒体细胞色素 b 序列部分片段。在鲇鱼野生种群所有可比较的 841 bp 序列中, 121 个个体共检测到 40 个变异位点 (占全部碱基数的 4.76%)。其中, 简约信息位点 35 个, 单突变位点 5 个, 未发现碱基的插入和缺失, 全部为转换和颠换 (表 1)。含有 10 个转换位点 (Ts), 1 个颠换位点 (Tv), 平均转颠换比 (Ts/Tv) 为 18.51。淮河鲇鱼野生种群 4 种碱基 A、T、C 和 G 含量分别为 27.44%、28.59%、29.55% 和 14.42%, 其中碱基 G 的含量显著低于其他碱基的含量, A + T 含量 (56.03%) 明显高于 C + G 含量 (43.97%)。

2.2 单倍型分布及单倍型聚类分析 利用 DnaSP 4.0 软件计算各种群的单倍型 (表 1),

鲇鱼不同种群中, 121 个体共检测出 32 个单倍型, 即 H1 ~ H32。其中, 27 个为独享单倍型, 占 84.37%, 5 个共享单倍型为 H2、H8、H11、H16 和 H22。单倍型 H22 分布最广, 所有种群均有出现, 频率也最高, 为 28.10% (34/121), 其次为 H2, 所有种群均有出现, 频率为 11.57%。单倍型 H22 和 H2 为淮河鲇鱼野生种群所有共享。Network 的 Median-joining 方法构建单倍型网络结构图显示出星状的分布态势, 没有将 32 个单倍型区分为对应不同地理区域或者地理种群的单系群。单倍型 H22 位于星状图的中心, 其他单倍型则经过 1 ~ 9 步突变与其相连 (图 2)。

2.3 种群遗传多态性参数统计 利用 DnaSP 4.0 软件计算各种群的单倍型多样性 (h)、平均核苷酸差异数 (K)、核苷酸多态性 (P_i), 结果见表 2。淮河野生鲇鱼 7 个种群的单倍型多样性 h 值较高, 而核苷酸多态性 P_i 值较低。其中, 明光野生种群单倍型多样性最高, 为 0.935 9, 六安种群单倍型多样性最低, 为 0.771 2; 洪泽湖种群的核苷酸多态性最高, 为 0.009 1, 淮滨种群核苷酸多态性最低 (0.001 4), 所有样本作为一个种群进行数据分析, 单倍型多样性为 0.884 8, 核苷酸多态性为 0.003 8。从衡量种群遗传水平的 K 值来看, 明光野生种群明显高于其他种群, 为 9.811 4。

2.4 种群遗传分化 种群间的序列差异反映的是生物间亲缘关系的远近, 使用 MAGA 3.0 软件中 Tamura-Nei 模型计算种群内及种群间的遗传距离 (表 3)。淮河野生鲇鱼不同种群间的遗传距离在 0.002 ~ 0.009 之间。结果表明, 信阳种群、淮滨种群和蚌埠种群之间的亲缘关系较近, 而洪泽湖种群与其他种群间的亲缘关系较远。将 7 个鲇鱼种群归为一组进行分子变异分析 (AMOVA) 的结果表明, 鲇鱼种群内存在较高的遗传变异 (88.50%), 而种群间的遗传变异较小 (12.92%) (表 4), 分子遗传变异主要来自地理区内种群间。鲇鱼 7 个种群两两比较的遗传分化指数 (F_{st}) 显示, 信阳种群和洪泽湖种群之间的遗传分化最大 ($F_{st} = 0.205 8$,

表 1 鲇鱼线粒体细胞色素 b 单倍型分布及单倍型的变异位点
 Table 1 Alignment of mtDNA Cyt b haplotypes of variable positions and distribution of mtDNA Cyt b haplotypes of *Silurus asotus*

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable sites								地理分布 Geographic distribution						合计 Total			
	2	2	2	2	3	3	4	4	XY	HB	FY	LA	BB	MG		HZL		
H1	ACCTCTCCTA	CGCCTCTCTA	ACACTCCTCC	GCAGAAAGAC														1
H2C.....C.....					2	1	2	4	3	1	1			14
H3G.....C..G.....C.....G.....							2							2
H4	..T.....C.....C.....										3				3
H5	..T.....C.....										1				1
H6	..T.....C.....										1				1
H7	..T.....C.....C.....										1				1
H8TC.....						1	2	2	2	2	1			10
H9TC.....G.....								1						1
H10TC.....C.....										2				2
H11TC.....A.....					1	1	1							3
H12TC.....C..A.....					1									1
H13C.....C..A.....					1									1
H14C.....A.....					1									1
H15	..A.....C.....G.....									2					2
H16C.....G.....					6		4		4		1			15
H17T.....G..G.....					1									1
H18C.....C.....									3					3
H19A..C.....							2							2
H20A..C.....G.....							1							1
H21C.....G.....						2								2
H22C.....					4	7	3	8	7	1	4			34
H23T.....C.....						1								1
H24C..C.....										2				2
H25C.....T.....											6			6
H26A.....C.....						3								3
H27C.....							1							1
H28A..T.....								1						1
H29	G.....	T...TATT..	C..G..	TGTC.T.TT..	TGA.G.A.T										2			2
H30	G.....	T...TATT..	CT.G..	TGTC.T.TT..	TGA.G.A.T										1			1
H31	G.....	TC..TATT..	C..G..	TGTC.T.TT..	TGA.G.A.T										1			1
H32	T...TATT..	C..G..	TGTC.T.TT..	TGA.G....										1			1

XY. 信阳; HB. 淮滨; FY. 阜阳; LA. 六安; BB. 蚌埠; MG. 明光; HZL. 洪泽湖; 圆点(.)表示与 H1 有相同的碱基组成; 变异位点中的数字由上至下为碱基变异位点在所测序列中的位置。

XY. Xinyang; HB. Huaibin; FY. Fuyang; LA. Liu'an; BB. Bengbu; MG. Mingguang; HZL. Hongze Lake. H1 to H32 indicate different haplotypes. A dot (.) indicates identity with H1 sequence. Numbers at the top of the figure indicate the variable sites in the sequence analysis based on H1.

表 3 鲇鱼种群间的遗传分化指数(左下角)和遗传距离(右上角)

Table 3 Fixation index (F_{st}) (below) and genetic distance (above) in seven populations of *Silurus asotus*

种群 Population	信阳 Xinyang	淮滨 Huaibin	阜阳 Fuyang	六安 Liu'an	蚌埠段 Bengbu	明光 Mingguang	洪泽湖 Hongze Lake
信阳 Xinyang		0.002	0.002	0.003	0.002	0.003	0.009
淮滨 Huaibin	0.134 3 **		0.002	0.003	0.002	0.002	0.008
阜阳 Fuyang	0.010 3	0.089 3 *		0.003	0.002	0.003	0.009
六安 Liu'an	0.047 7	0.005 9	0.014 1		0.003	0.003	0.008
蚌埠段 Bengbu	0.030 3	0.169 4 **	0.012 3	0.050 0		0.002	0.008
明光 Mingguang	0.154 2 **	0.174 9 **	0.099 0 *	0.040 8	0.163 7 **		0.008
洪泽湖 Hongze Lake	0.205 8 **	0.172 4 **	0.159 5 **	0.084 2	0.180 6 **	0.179 2 **	

* 示鲇鱼种群间的遗传分化指数差异显著 ($P < 0.05$), ** 示鲇鱼种群间的遗传分化指数差异极显著 ($P < 0.01$)

* Means significant difference of F_{st} in seven populations of *Silurus asotus* ($P < 0.05$), ** Means great significant difference of F_{st} in seven populations of *Silurus asotus* ($P < 0.05$).

表 4 鲇鱼种群分子变异分析结果

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the *Silurus asotus* populations

遗传差异来源 Source of variation	自由度 Degrees of freedom	变异组成 Variance components	变异百分比(%) Percentage of variance
地理区间 Among regions	1	-0.022 9	-1.42
地理区内种群间 Among populations within regions	5	0.209 1	12.92
种群内 Within populations	114	1.432 4	88.50
总计 Total	120	1.618 5	100.00

遗传分化指数(F_{st}): 0.115 0 ($P < 0.01$)。Genetic fixations index (F_{st}): 0.115 0 ($P < 0.01$)。

群、明光种群的所有单倍型和洪泽湖种群的部分单倍型聚在一起组成;支系 B 由洪泽湖种群中剩余的部分单倍型相聚组成。从图 3 可以看出,7 个种群单倍型的拓扑结构未完全显示与地理位置相关的信息,并且单倍型间系统关系的支持率均高于 50%。

2.6 种群历史 本文采用线粒体 DNA 单倍型错配分布、无限突变位点模型的中性检验值 Tajima's D 和 Fu's F_s 等方法同时调查淮河鲇鱼种群历史变动(表 2)。7 个种群的 Tajima's D 值为 -2.086 0 ~ 0.820 9,除了六安种群达到显著水平($P < 0.01$)外,其他种群均未达到显著水平($P > 0.10$)。Fu's F_s 值为 -4.969 7 ~ 2.059 0,除了洪泽湖种群为正值,其他种群均为负值。故将淮河鲇鱼所有个体作为一个整体进行分析,发现 Tajima's D 值(-1.708 1, $P < 0.05$)与 Fu's F_s 值(-18.534 7, $P < 0.05$)均为负值,达到显著水平。错配分布结果显示,淮河鲇鱼种群单倍型和碱基差异呈单峰分布(图

4),显示淮河鲇鱼种群曾作为一个整体经历过种群扩张。根据公式 $\tau = 2ut$ 计算淮河鲇鱼种群的大约扩张时间,彭作刚等(2002)报道中国鲇形目鲮科鱼类的线粒体 DNA 进化速率约为每百万年 0.18% ~ 0.30%,另外根据野外调查工作和褚新洛等(1999)的研究结果,淮河鲇鱼性成熟年龄约为 1 年。通过 AMOVA 分析表明 $\tau = 1.775 6$,淮河鲇鱼种群的扩张时间可能是在距今 0.17 ~ 0.29 百万年前。

3 讨论

3.1 鲇鱼种群的遗传多样性 遗传多样性的研究是生物多样性研究的重要内容,只有通过遗传多样性的研究才能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化。淮河鲇鱼细胞色素 b 基因序列的碱基平均含量与彭作刚等(2005)研究的鲇形目鱼类和何舜平等(2004)研究的鲤科鱼类相似,其中碱基 G 的含量显著低于其他碱基的含量,核苷酸碱基构成的偏倚是线粒

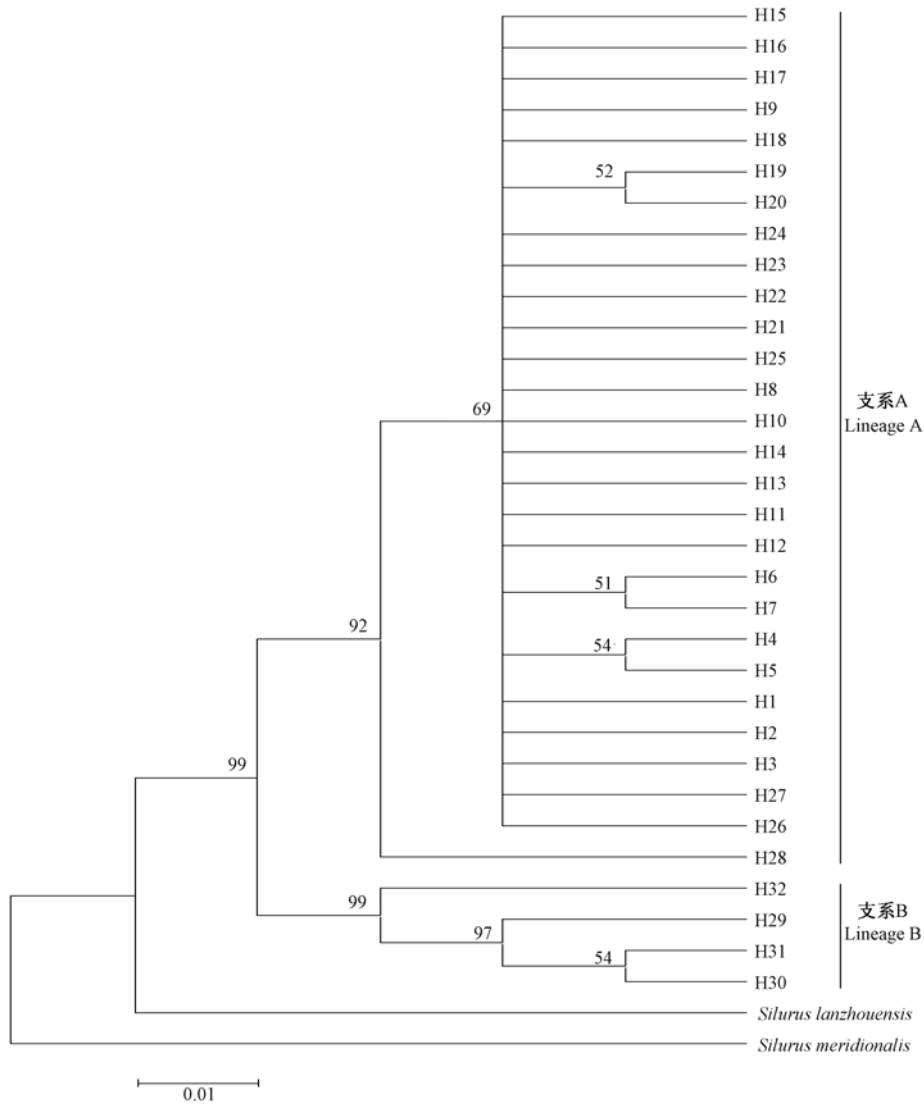


图3 鲇鱼不同种群各单倍型基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列构建的 NJ 树
Fig. 3 Molecular phylogenetic tree of mitochondrial Cyt *b* gene among haplotypes of *Silurus asotus* constructed by the method of NJ

H1 ~ H32 表示单倍型 1 至单倍型 32; 标尺表示进化距离为每个位点发生 0.01 个碱基替换; 分支处数字表示 bootstrap 支持率。
Silurus lanzhouensis 为兰州鲇 (HQ890503.1), *Silurus meridionalis* 为南方鲇 (AF416892.1)。

H1 to H32 indicate different haplotypes of *Silurus asotus* from Huaihe River. Scale bar indicates a genetic distance of 0.01 nt substitutions per site. Numbers in the nodes of cladogram indicate bootstrap values.

体蛋白质编码基因包括细胞色素 *b* 基因的一个典型特征 (彭作刚等 2002)。核苷酸多态性 (P_i) 作为一个衡量种群间遗传多态性的重要指标, 表示各种 mtDNA 单倍型在种群中所占的比例。在鲇鱼野生种群中 121 个个体共检测出 32 个单倍型, 表明淮河鲇鱼群体存在丰富的

mtDNA 多态性。与研究的硬骨鱼类 (Watanabe et al. 2007, 梁晓旭等 2010, 金菊等 2011) 相比, 淮河鲇鱼野生种群平均单倍型多样性 ($h = 0.8848$) 和核苷酸多态性 ($P_i = 0.0038$) 相对较高, 显示较高的遗传多样性。这与兰州鲇 3 个种群单倍型多样性和核苷酸多样性指数相当

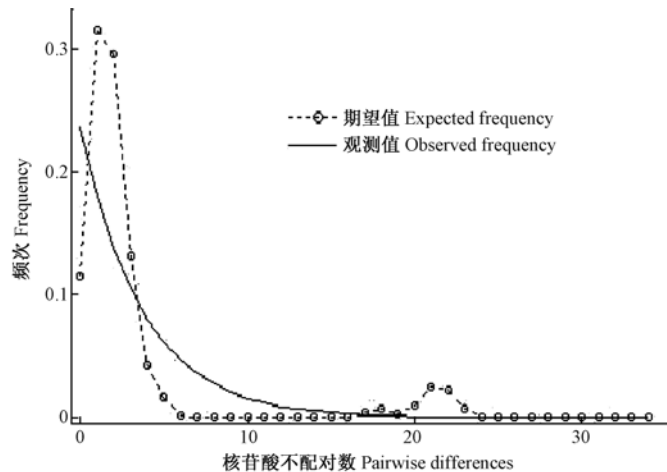


图 4 以种群变异分布检测淮河鲇鱼种群扩张结果

Fig. 4 Frequency distributions of pairwise number of mutational differences in the mtDNA Cyt b in *Silurus asotus*

(肖伟等 2011)。相对较高 h 值、低 P_i 值表明鲇鱼这个种群可能是由一个较小的有效种群经历瓶颈效应或建群者效应 (bottlenecks or founder events) 后迅速增长, 尽管变异导致单倍型的多样性的积累, 但核苷酸序列的多样化还未能积累 (Grant et al. 1998, Avise 2000)。淮河流域的环境污染、水利工程及人类生产活动等对淮河鲇鱼渔业资源造成了难以逆转的破坏, 淮河鲇鱼仍然保持足够的遗传变异。反映了鲇鱼作为我国鲇形目分布最广且产量较高的重要淡水经济鱼类特殊的生命进化历程和适应复杂环境的能力。另外, Marshall 等 (1975) 认为, 在群体遗传多样性研究中, 要充分考虑样本量对不同遗传多样性度量指标的影响, 样本量的不足会增大分化种群被检测成同一种群的概率。所检测出的种群基因丰富度的差异在某些情况下很可能主要是由样本量的差别所引起的, 而不能反映出种群间的客观差别。李思发 (1998) 在应用同工酶技术进行淡水鱼类种质研究中认为, 样本容量应大于 30, 李鸥等 (2009) 认为样本量应达到 40, 从而避免由人为选择的偏差对群体遗传多样性水平的正确评估所造成的影响。本实验样本量小于 30, 且采样点较少, 可能影响淮河鲇鱼群体遗传多样性水平的正确评估。

3.2 鲇鱼种群遗传结构分析 陈大庆等 (2006) 认为种群间的遗传距离以及种群分化指数是衡量种群多态程度的重要指标, 二者的值越大, 种群多态性程度越高。淮河野生鲇鱼不同种群间的遗传距离在 0.002 ~ 0.009 之间, 整体上反映了信阳种群、淮滨种群和蚌埠种群之间的亲缘关系较近, 洪泽湖种群与其他种群间的亲缘关系较远。根据 Wright (1949) 关于遗传分化指数的大小和分化程度的解释, F_{st} 值 0 ~ 0.05 表示低度遗传分化, F_{st} 值 0.05 ~ 0.15 表示中度遗传分化, F_{st} 值 0.15 ~ 0.25 说明遗传分化比较大。淮河鲇鱼种群间的遗传分化指数 (F_{st}) 为 0.115 0, 表明淮河鲇鱼种群存在中度遗传分化。而 AMOVA 分析结果显示, 淮河鲇鱼种群内遗传变异 (88.50%) 明显高于种群间的遗传变异 (12.92%) (表 4), 说明遗传变异主要来自种群内部, 种群间的遗传分化较小, 其原因可能是它们分布于同一水系。从 N_m 值来看, 基因流是一个群体迁移至另一个群体时将某基因带到新的群体产生的基因流动, Millar 等 (1991) 认为: 当 $N_m > 1$, 表明群体间的基因流水平较高, 群体间遗传分化较小; 当 $N_m > 4$ 时, 种群间的基因交流就更为充分, 遗传分化更小。淮河鲇鱼野生种群间的基因流均值为 3.85, 表明淮河鲇鱼野生群体间的基因流的水

平较高,群体间遗传分化较小,这得益于单倍型 H22 和 H2 为淮河野生鲇鱼种群所有共享,并拥有相对高的频率(表 1)。这与 AMOVA 分析结果一致,但与遗传分化指数分析不一致。其原因是基因流大于 1 时, Slatkin (1987) 认为基因流就可以阻止由遗传漂变而引起的种群间的分化,基因流是种群间遗传分化的主要因素。姜虎成等(2012)认为淮河流域历来都是洪水多发的区域。中游下段河床纵剖面倒比降和洪泽湖水面抬高使得中上游干流受湖水顶托,坡降变缓,增加了支流排洪的困难。汛期干支流同时涨水,支流入淮处往往引起长久的倒漾。洪水泛滥在一定程度上加大了群体间的交流机会,使得淮河鲇鱼种群没有形成明显分化。聚类先后顺序反映了种群间亲缘关系的远近。以邻接法(NJ)构建的淮河鲇鱼 Cyt *b* 单倍型系统发育关系树(图 3)及网状亲缘关系图(图 2)均表明,7 个种群可聚为两个谱系,但这两个谱系与地理分布不相关,表明淮河鲇鱼正处于谱系重排(lineage sorting)阶段。

3.3 鲇鱼种群历史 Tajima's *D* 中性检验常用以推测种群曾经历的历史事件。如果 Tajima's *D* 呈负值,且在统计学上达到显著标准,则说明序列中含有比中性进化模型中更多的核苷酸位点变化,可能预示着该种群曾经有过扩张的历史。种群历史变动分析结果显示,淮河鲇鱼所有个体作为一个整体其 Tajima's *D* 值(-1.708 1, $P < 0.05$)与 Fu's *F_s* 值(-18.534 7, $P < 0.05$)均为负值,达到显著水平。错配分布(mismatch distribution)呈现单峰型,表明此种群历史上曾经发生过种群扩张。Network 的 Median-joining 方法构建单倍型网络结构图显示出单倍型 H22 位于星状图的中心,其他单倍型则经过 1~9 步突变与其相连(图 2)。依据溯祖理论(coalescence theory),线粒体细胞色素 *b* 基因单倍型的星状拓扑结构暗示淮河鲇鱼种群经历了明显的种群扩张(Slatkin et al. 1991)。单倍型 H22 由于其分布最广和享有该单倍型的个体在所有的种群中所占的比重也明显的高于其他单倍型,而且在网状图中

处于基部位置,说明单倍型 H22 可能是原始的单倍型。我们估计种群扩张时期可能是在距今 0.17~0.29 百万年前,处于中更新世中期和末期。刘嘉麒等(1997)和张光业(1985)认为此时气候转变为温暖湿润的间冰期气候,降雨量增多,鱼类随着冰缘退缩和雨水的流动进行种群扩张成为可能。

本实验受样本数和采样点的局限,也没有以前关于淮河鲇鱼遗传多样性研究的资料,因此不能从单个线粒体基因评判过度捕捞和自然环境破坏对野生淮河鲇鱼种群遗传多样性的影响程度。应增加样本数和采样点,综合运用多种分子标记,如主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)、微卫星(simple sequence repeats, SSR)等进一步研究淮河鲇鱼的遗传多样性及其适应机制。

参 考 文 献

- Avice J C. 2000. Phylogeography the History and Formation of Species. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press.
- Bandelt H J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37-48.
- Bennetts R Q, Grady J M, Rohde F C. 1999. Discordant patterns of morphological and molecular change in broadtail madtoms (genus *Noturus*). *Molecular Ecology*, 8(10): 1563-1569.
- Bermingham E, Avise J C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113(4): 939-965.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Grant W S, Bowen B W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. Mega 3.0: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150-163.
- Marshall D R, Brown A H D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation // Frankel O H, Hawkes J G. *Corp Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge:

- Cambridge University Press, 53 – 80.
- Millar C L, Libby W J. 1991. Strategies for conserving clinal, Cootypic, Ana disjunct population diversity in widespread species // Fald D A, Holsinger K E. Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press, 149 – 170.
- Oleinik A G, Skurikhina L A, Brykov V A. 2007. Divergence of *Sabvelinus* species from northeastern Asia based on mitochondrial DNA. Ecology of Freshwater Fish, 16(1): 87 – 98.
- Perdices A, Sayanda D, Coelho M M. 2005. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. Molecular Phylogenetics and Evolution, 37(3): 920 – 927.
- Rogers A R, Harpending H C. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution, 9(3): 552 – 569.
- Rozas J, Sánchez-del B J C, Messeguer X, et al. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19(18): 2496 – 2497.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 236(4803): 787 – 792.
- Slatkin M, Hudson R R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. Genetics, 129(2): 555 – 562.
- Telatchea F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 19(3): 265 – 293.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25(24): 4876 – 4882.
- Watanabe K, Jang-Liaw N H, Zhang C G, et al. 2007. Comparative phylogeography of bagrid catfishes in Taiwan. Ichthyological Research, 54(3): 253 – 261.
- Wen H S, Lin H R, Mao Y Z, et al. 2003. Annual variations of gonadotropin content and ovarian development of feral female catfish, *Silurus asotus*, in central China. Environmental Biology of Fishes, 68(3): 283 – 291.
- Wright S. 1949. The genetical structure of population. Annals of Eugenics, 15(1): 323 – 334.
- Xiao W H, Zhang Y, Liu H Z. 2001. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. Molecular Phylogenetics and Evolution, 18(2): 163 – 173.
- 陈大庆, 张春霖, 鲁成, 等. 2006. 青海湖裸鲤繁殖种群线粒体基因组 D-loop 区序列多态性. 中国水产科学, 13(5): 800 – 806.
- 陈定福, 何学福, 周启贵. 1990. 南方大口鲇和鲇鱼的含肉率及鱼肉的营养成分. 动物学杂志, 25(1): 7 – 9.
- 陈湘彝. 1977. 我国鲶科鱼类的总述. 水生生物学集刊, 6(2): 197 – 218.
- 褚新洛, 郑葆珊, 戴定远, 等. 1999. 中国动物志: 硬骨鱼纲鲇形目. 北京: 科学出版社, 77 – 87.
- 耿德贵, 朱玉山, 刘贤德. 1999. 鲇鱼染色体的显带研究. 动物学杂志, 34(2): 54 – 57.
- 何舜平, 刘欢章, 陈宜瑜, 等. 2004. 基于细胞色素 *b* 基因序列的鲤科鱼类系统发育研究(鱼纲: 鲤形目). 中国科学 C 辑: 生命科学, 34(1): 96 – 104.
- 胡贤江, 潘庭双, 侯冠军, 等. 2002. 安徽省野生鲇鱼资源现状和保护利用价值. 安徽农业科学, 30(2): 233 – 247.
- 姜虎成, 冯建彬, 丁怀宇, 等. 2012. 淮河水系日本沼虾群体遗传结构和系统演化的线粒体 *CO I* 序列分析. 动物学杂志, 47(2): 73 – 84.
- 金菊, 刘明典, 阴双雨, 等. 2011. 澜沧江老挝纹胸 Cyt *b* 基因的序列变异与遗传结构分析. 遗传, 33(3): 255 – 261.
- 李鸥, 赵莹莹, 郭娜, 等. 2009. 草鱼种群 SSR 分析中样本量及标记数量对遗传多度的影响. 动物学研究, 30(2): 121 – 130.
- 李思发. 1998. 中国淡水主要养殖鱼类种质资源研究. 上海: 上海科学技术出版社.
- 李学英, 王大忠, 廖吉文. 2001. 长江流域南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 和鲇 (*Silurus asotus*) 分子遗传标记的建立. 遵义医学院学报, 24(3): 217 – 218.
- 梁晓旭, 庆宁, 杨柯林, 等. 2010. 广东地区宽鳍鱮种群遗传变异和亲缘地理. 水生生物学报, 34(4): 806 – 814.
- 刘宏毅, 黎明星, 肖俊, 等. 2011. 基于 Cyt *b* 基因序列研究 5 个地理种群叉尾斗鱼的遗传变异. 水生生物学报, 35(6): 1038 – 1042.
- 刘嘉麒, 王文远. 1997. 第四纪地质定年与地质年表. 第四纪研究, 17(3): 193 – 202.
- 彭作刚, 何舜平, 张耀光. 2002. 细胞色素 *b* 基因序列变异与东亚鲶科鱼类系统发育. 自然科学进展, 12(6): 596 – 600.
- 彭作刚, 张耀光, 何舜平, 等. 2005. 从细胞色素 *b* 基因序列变异分析中国鲇形目鱼类的系统发育. 遗传学报, 32(2): 145 – 154.
- 王庆容, 王乾兴, 李学英, 等. 2008. 南方鲇和鲇线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段的 RFLP 对比分析. 遵义医学院学报, 10(1): 46 – 49.
- 王庆容, 李黛. 2009. 鲇细胞色素 *b* 基因序列差异及遗传多样性分析. 水生态学杂志, 2(1): 40 – 44.

- 魏刚, 黄林. 1997. 鲇繁殖生物学的研究. 水产学报, 21(3): 225-232.
- 肖伟, 侯玉霞, 蔡原, 等. 2011. 基于线粒体细胞色素 *b* 基因的 3 个兰州鲇种群的遗传多样性分析. 甘肃农业大学学报, 46(2): 11-16.
- 阎伍玖, 蒋余根, 柳丹. 2004. 淮河安徽段水环境污染现状与防治对策. 水土保持学报, 18(2): 21-24.
- 张光业. 1985. 河南省第四纪古地理的演变. 河南大学学报: 自然科学版, 15(3): 11-22.

安徽牯牛降发现短尾鸦雀

2012 年, 作者在安徽省牯牛降国家级自然保护区综合考察期间, 于 9 月 21 日在大历山脚下的新联村附近的竹林中(117°30'46.7"E, 30°06'28.1"N, 海拔 158 m)发现 28 只短尾鸦雀(*Paradoxornis davidianus*)结群在竹林中下层活动。该竹林位于农田旁边, 附近有一条溪流穿过, 周围山坡为亚热带常绿阔叶林。

作者对其行为进行了观察并拍摄到清晰照片。该鸟的主要识别特征为: 体型小; 尾羽较短, 棕褐, 羽缘棕色; 头栗色; 背部棕灰; 翅羽灰褐, 颈及喉黑, 胸灰白, 腹棕灰; 虹膜褐色; 喙粗厚、近粉色, 脚近粉色; 轻声的啾啾鸣叫。

短尾鸦雀为鹛科鸦雀属的鸟类, 该物种的模式产地在福建西北部挂墩, 俗名挂墩鸦雀。根据文献记载, 短尾鸦雀在国外分布于中南半岛的北部, 在国内目前仅见于福建武夷山、江西齐云山、浙江四明山、湖南莽山等局部地区。

根据《中国鸟类分类与分布名录》(郑光美 2011)和《中国鸟类野外手册》(约翰·马敬能等 2000)以及其他相关资料, 确认在牯牛降保护区发现的短尾鸦雀为安徽省雀形目鸟类新纪录。

短尾鸦雀为全球性易危种, 数量稀少, 分布区狭窄, 在动物分布上被列为局部分布的典型代表。作为典型的森林生态系统类型的保护区, 安徽省牯牛降国家级自然保护区环境质量良好, 森林植被保存完整, 此次短尾鸦雀在该区的发现, 也是一个例证。

李永民^{①②} 薛辉^① 吴孝兵^{①*} 顾长明^③ 陈文豪^④ 吴建中^⑤

① 安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000; ② 阜阳师范学院生命科学学院 阜阳 236037;

③ 安徽省自然保护管理站 合肥 230001; ④ 安徽省牯牛降国家级自然保护区石台保护站 石台 245100;

⑤ 安徽省牯牛降国家级自然保护区祁门保护站 祁门 245600

* 通讯作者, E-mail: wuxb@mail.ahnu.edu.cn。