

基于 *COI* 基因的光倒刺鲃群体遗传多样性与遗传分化研究李文俊¹, 李强^{1*}, 韩崇¹, 李陇旭¹, 易祖盛¹, 桂林¹, 钟良明²

(1. 广州大学生命科学学院, 广东广州 510006; 2. 韶关金粤水产科技有限公司, 广东韶关 512335)

摘要 [目的] 全面了解光倒刺鲃的遗传多样性和遗传结构, 为其种质资源保护和利用提供科学依据。[方法] 采用自行设计的引物对 9 条水系共 209 尾光倒刺鲃样本的线粒体 *COI* 基因序列进行测定与分析, 并探讨其遗传结构和遗传多样性水平。[结果] 在 209 条 *COI* 基因序列中, 共检测到 12 个单倍型, 单倍型多样性为 0.801, 核苷酸多样性为 0.008 2。单倍型系统树显示, 所有群体聚成 2 支, 东江群体的全部样本及北江、赣江和九龙江水系的部分样本组成 I 支, 其余样本组成 II 支。单倍型网络分析显示, 东江群体单倍型与北江、赣江和九龙江部分个体关系较近, 但与其他个体关系相对较远; 珠江水系大部分群体与长江、钱塘江、九龙江大部分群体分布于不同的分支。AMOVA 分析表明, 光倒刺鲃 *COI* 基因序列变异主要来自地理区内群体间, 占 82.33%。错配分析及中性检验显示, 大多数群体相对稳定, 未发生过群体扩张。[结论] 光倒刺鲃群体的遗传多样性总体偏低, 应加强对其种质资源的保护; 东江水系与珠江水系其他群体既存在一定隔离, 又存在着基因交流; 珠江水系群体与长江水系群体间分化明显。

关键词 光倒刺鲃; *COI* 基因; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)22-0125-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.22.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Genetic Diversity and Genetic Differentiation of *Spinibarbus hollandi* Based on *COI* gene

LI Wen-jun, LI Qiang, HAN Chong et al (School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract [Objective] To understand the genetic diversity and genetic structure of *Spinibarbus hollandi* more comprehensively, and provide scientific basis for the conservation and utilization of its wild germplasm resources. [Method] The mitochondrial *COI* gene sequences of 209 *S. hollandi* samples from 9 rivers were determined and analyzed with designed primers, and its genetic diversity and genetic differentiation level were discussed. [Result] Among 209 *COI* gene sequences, 12 haplotypes were detected, with haplotype diversity of 0.801 0 and nucleotide diversity of 0.008 2. Phylogenetic tree of haplotypes showed that all haplotypes gathered into two branches (branches I: all the samples Dongjiang population and some individuals of Beijiang, Ganjiang and Jiulong River). Network analysis of haplotypes showed that haplotype of Dongjiang population was closely related to some individuals in Beijiang, Ganjiang and Jiulong River, but far related to other individuals. The majority of the population of the Pearl River distributed in different branches compared with the majority of the population of the Yangtze River, Qiantang River, and Jiulong River. AMOVA analysis showed that the variation of *COI* gene sequences of *S. hollandi* was mainly from within groups, accounting for 82.33%. Mismatch analysis and neutral test showed that most populations were relatively stable without population expansion. [Conclusion] The genetic diversity of *S. hollandi* population is generally low, so the protection of its germplasm resources should be strengthened. There is not only certain isolation but also gene exchange between Dongjiang population and other populations in the Pearl River. There is obvious differentiation of populations between the Pearl River and the Yangtze River.

Key words *Spinibarbus hollandi*; Cytochrome oxidase subunit I sequence; Genetic diversity; Genetic differentiation

鱼类线粒体 DNA 已成为研究鱼类进化遗传与系统演化关系的重要分子标记, 广泛应用于群体遗传学研究^[1]。而细胞色素氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, *COI*) 为线粒体 13 个蛋白编码基因中研究最为清楚的基因之一, 其进化速率较低, 包含的遗传进化信息量大, 已被广泛应用于种群分析、系统发育和种类鉴别等研究领域^[2-3]。光倒刺鲃 (*Spinibarbus hollandi*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae) 倒刺鲃属 (*Spinibarbus*), 分布于华东及华南诸水系^[4-5], 是一种重要的名优经济鱼类。随着光倒刺鲃的人工驯养及繁育技术获得成功及多年的推广养殖, 现已成为华南及华东等地重要的养殖鱼类之一。近年来, 由于过度捕捞、环境污染及水利工程建设等原因, 光倒刺鲃自然资源量不断减少。然而, 目前有关光倒刺鲃群体遗传多样性、遗传结构及亲缘地理等方面的研究较少^[6-8]。本研究采集了 9 个群体的光倒刺鲃样本, 对其线粒体 *COI* 基因序列进

行了测定与分析, 旨在全面了解其遗传多样性和遗传结构, 为其种质资源保护和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集 所用样品于 2019 年 5—12 月采自广西、广东、湖南、江西、福建和浙江等地。将所有个体按所采样的水系进行群体划分。各采样点和样品信息见图 1 和表 1。

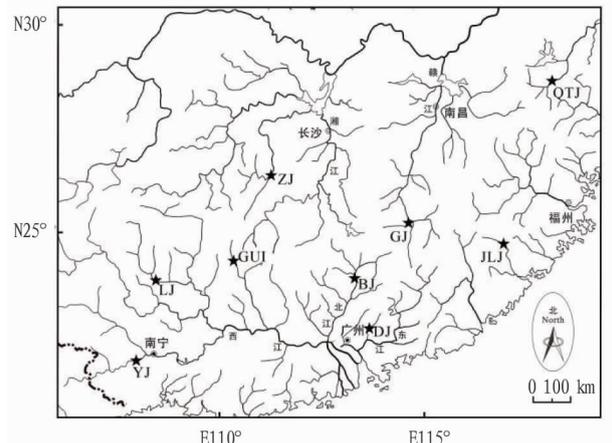


图 1 光倒刺鲃采样分布点

Fig.1 Sampling sites for *S. hollandi***基金项目** 广州市科技计划项目(201804010486)。**作者简介** 李文俊(1991—), 男, 广东茂名, 硕士, 从事鱼类生态学研究。* 通信作者, 实验师, 博士, 从事淡水鱼类生态与亲缘地理研究。**收稿日期** 2021-02-26; **修回日期** 2021-03-25

表1 光倒刺鲃样品信息

Table 1 Sample information of *S.hollandi*

水系 River system	群体 Populations	采集地 Locations
珠江水系 Pearl River system	北江(BJ)	韶关
	东江(DJ)	增城
	柳江(LJ)	河池
	桂江(GUI)	桂林
长江水系 Yangtze River system	郁江(YJ)	南宁
	赣江(GJ)	赣州
	资江(ZJ)	邵阳
九龙江 JIJ		漳平
钱塘江 QTJ		衢州

1.2 DNA 提取及测序 基因组 DNA 使用 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程股份有限公司,上海)提取。PCR 扩增采用自行设计的引物进行,其序列分别为 L:5'-GGGCTGATAG-GAAGAGGACTT-3';H:5'-GATGAGTTGGACAGGACGATT-3'。PCR 反应体系(25 μ L):PCR Master Mix 12.5 μ L, 10 mmol/L引物各 1.0 μ L,模板 DNA 3.0 μ L 及 ddH₂O 7.5 μ L 混合。扩增程序:①94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;②94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,③55 $^{\circ}$ C 退火 30 s;④72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,重复 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸

10 min。PCR 产物由生工生物工程股份有限公司纯化并测序。

1.3 数据分析 通过 DNASTAR 程序对序列进行拼接,使用 Muscle 软件进行比对分析。利用 MEGA 6.0 软件计算群体遗传距离,基于邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建单倍型系统树^[9]。使用软件 DNAsp 5.0^[10] 和 Arlequin 3.5^[11] 统计各群体的核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)与单倍型多样性(haplotype diversity, h),进行错配分布(mismatch distribution)分析、中性检验以及分子变异分析(AMOVA)。使用 Network 10.0 软件构建各单倍型之间的网络关系图。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析 在 209 个 *COI* 序列中,共检测到 12 个单倍型。有 4 个为多群体共享的单倍型,其余为单个群体特有单倍型。单倍型多样性为 0.801,核苷酸多样性为 0.008 2(表 2)。其中,北江、赣江及资江群体的单倍型多样性高于其他群体,均大于 0.500,其他群体的单倍型多样性较低。此外,北江、赣江及九龙江群体的核苷酸多样性较其他群体高, π 值均大于 0.004 0,而其他群体的核苷酸多样性较低, π 值均在 0.001 0 以下。

表2 光倒刺鲃样品遗传多样性分析

Table 2 Analysis of genetic diversity of *S.hollandi*

群体 Population	样品数 Sample size	单倍型数 No. of haplotypes	单倍型(个体数) Haplotypes	单倍型多样性 Haplotype diversity(h)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity(π)
北江 BJ	35	2	H1(17)、H2(18)	0.514	0.010 0
东江 DJ	20	1	H1(20)	0	0
柳江 LJ	20	2	H2(1)、H3(19)	0.100	0.000 2
桂江 GUI	20	1	H2(20)	0	0
郁江 YJ	20	3	H2(18)、H4(1)、H5(1)	0.195	0.000 3
赣江 GJ	48	5	H1(6)、H6(1)、H7(3)、H8(18)、H9(20)	0.680	0.004 5
资江 ZJ	6	2	H10(2)、H11(4)	0.533	0.000 5
九龙江 JIJ	20	2	H8(17)、H12(3)	0.268	0.004 4
钱塘江 QTJ	20	2	H8(19)、H9(1)	0.100	0.000 1
全部样本 Total	209	12	—	0.801	0.008 2

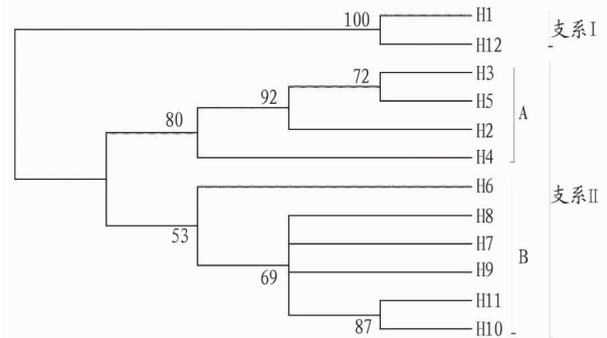
2.2 遗传距离及遗传分化水平 遗传距离分析可知(表 3),东江群体与其他群体的遗传距离均相对较高。除北江群体外,东江与其他群体间遗传距离均大于 0.015 0,北江与其他群体间遗传距离次之。遗传分化分析显示,北江群体与其他

群体间遗传分化指数均较低,小于 0.500 0;除北江群体外,东江群体与其他群体的遗传分化指数均较高;钱塘江群体与北江、赣江及九龙江的遗传分化指数较低,与其他群体的遗传分化指数均较高。

表3 基于 *COI* 基因的光倒刺鲃群体遗传距离(对角线下方)和遗传分化指数(% 对角线上方)Table 3 Genetic distance(below diagonal) and genetic variation value(above diagonal) of *COI* gene of *S.hollandi*

群体 Group	北江 BJ	东江 DJ	郁江 YJ	柳江 LJ	桂江 GUI	赣江 GJ	资江 ZJ	九龙江 JIJ	钱塘江 QTJ
北江 BJ	—	0.432 6	0.395 6	0.484 0	0.403 3	0.348 6	0.449 1	0.290 9	0.455 3
东江 DJ	0.010 2	—	0.992 5	0.995 4	1.000 0	0.805 9	0.994 6	0.855 1	0.997 2
郁江 YJ	0.009 7	0.019 8	—	0.878 1	0	0.542 0	0.948 1	0.616 2	0.951 8
柳江 LJ	0.011 5	0.021 7	0.002 0	—	0.947 4	0.635 6	0.968 3	0.707 8	0.974 8
桂江 GUI	0.009 6	0.019 8	0.000 1	0.001 9	—	0.552 0	0.983 0	0.635 0	0.987 7
赣江 GJ	0.011 1	0.016 0	0.006 5	0.008 2	0.006 4	—	0.370 0	0.016 0	0.083 7
资江 ZJ	0.013 3	0.020 5	0.006 6	0.008 4	0.006 5	0.005 3	—	0.394 3	0.927 3
九龙江 JIJ	0.010 7	0.015 5	0.006 2	0.008 0	0.006 1	0.004 6	0.005 1	—	0.103 2
钱塘江 QTJ	0.010 7	0.017 8	0.004 0	0.005 8	0.003 9	0.002 7	0.002 6	0.002 6	—

2.3 亲缘关系 对 12 个单倍型进行系统发育分析,构建系统发育树(图 2)和单倍型网络图(图 3)。从图 2 可见,所有光倒刺鲃群体聚成 2 个支系。其中东江群体与部分北江、赣江和九龙江群体的个体组成了支系 I。而在支系 II 中,又可分为 A 和 B 2 个姐妹支系。A 支为珠江水系的样本,包含柳江、郁江的全部样本及北江的部分样本;B 群则包含资江、钱塘江的全部样本及赣江和九龙江的大部分样本。单倍型网络图(图 3)也可分为 3 个分支。其中长江水系的资江和赣江群体、钱塘江群体及九龙江的部分单倍型共同聚为分支 1,而珠江水系(柳江、桂江及郁江群体的所有单倍型及北江群体的部分单倍型)单独聚为分支 3。东江群体与部分北江和赣江个体共享的单倍型 H1 与九龙江的单倍型 H12 聚为分支 2,两者亲缘关系较近,遗传变异仅 3 步,但与其他分支单倍型的变异达到 16 步以上。以上表明东江群体与其他群体相比,存在较明显的遗传分化,但同时又与部分北江、赣江和九龙江的部分个体存在较近的亲缘关系;另外,珠江水系与长江、九龙江和钱塘江水系之间也存在较明显的分化。



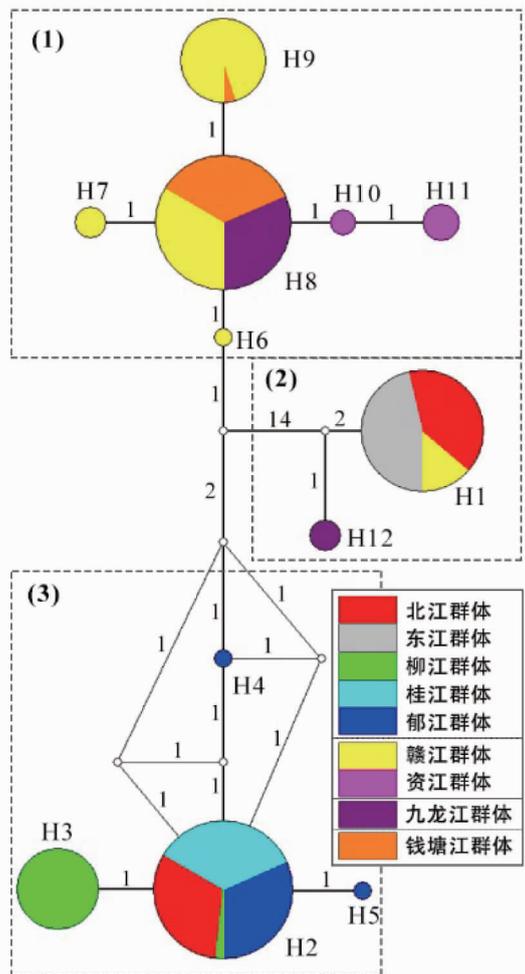
注:节点处的数值为邻接分析中所得的支持率(仅显示大于 50%的)
Note: The numbers above nodes represent Neighbor-joining bootstrap support (above 50% are shown)

图 2 光倒刺鲃群体单倍型的 NJ 树

Fig.2 Neighbor-joining tree of haplotypes of *S.hollandi* populations

2.4 分子变异分析 为了解光倒刺鲃种群分子变异的分布模式,根据水域分布将光倒刺鲃群体分成珠江、长江、九龙江和钱塘江 4 个地理区,进行分子变异分析。分析表明,光倒刺鲃地理区之间变异占 20.72%,地理区内群体间占 82.33%,群体内的变异占 38.39%。这说明光倒刺鲃 *COI* 基因的遗传分化主要来自地理区内的群体之间。

2.5 种群动态分析 对各群体进行中性检验分析发现,在 Tajima's *D* 检验中,郁江和柳江的 Tajima's *D* 值均为负值且统计检验均显著 ($P < 0.05$),其余群体为正值或为负值,但统计检验不显著;而在 Fu's *F_s* 检验统计中,除郁江群体的 Fu's *F_s* 值为显著的负值 ($P < 0.05$) 外,其余群体为正值或负值,但统计检验不显著,说明郁江群体可能发生过扩张。在错配分析中,郁江群体的歧点分布图呈现单峰型,进一步说明郁江群体经历过扩张。因此,综上可知郁江群体可能发生过扩张,而全部群体和其他各个群体相对稳定,未发生过扩张。



注:白色圆圈表示未被采集到的单倍型;两单倍型之间的数字表示单倍型间发生的核苷酸变异数;(1)为分支 1,(2)为分支 2,(3)为分支 3

Note: The white circles represent uncollected haplotypes. Numbers at nodes indicate number of nucleotide changes between haplotype; (1) is brach 1, (2) is brach 2, (3) is brach 3

图 3 光倒刺鲃群体单倍型网络图

Fig.3 The haplotype network of *S.hollandi* populations

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 光倒刺鲃的遗传多样性。遗传多样性是物种适应性和进化的基础,种内的遗传多样性与该物种对环境的适应能力呈正向线性关系^[12]。核苷酸多样性和单倍型多样性是衡量一个群体 mtDNA 变异程度的重要指标^[13]。该研究基于 *COI* 序列的光倒刺鲃核苷酸多样性 π 值为 0.008 2,整体遗传多样性较低,与同区域或邻近区域的黄尾鲴 (*Xenocypris davidi*)^[14] 和银鲴 (*Xenocypris argentea*)^[15] 等鱼类相仿。所有群体比较而言,北江、赣江和九龙江群体的核苷酸多样性相对较高,而东江、桂江、郁江、资江和钱塘江群体的核苷酸多样性均较低。造成光倒刺鲃群体遗传多样性较低的原因可能有:①光倒刺鲃为产区重要的经济鱼类,但部分水域不合理捕捞行为尚未得到遏制,可能使光倒刺鲃的群体数量大幅下降,影响了其遗传多样性;②随着各个流域中建设大量水利

工程,造成鱼类栖息地严重萎缩和破碎化分布,阻隔了各水系间基因交流,也可能导致光倒刺鲃群体遗传多样性进一步降低。除此之外,河流水质污染也是影响鱼类多样性的重要因素。光倒刺鲃为产区重要的经济鱼类具有较大的经济价值,为了持续利用其种质资源,应积极保护其种内遗传多样性。目前,我国已经建立了多个光倒刺鲃国家级种质资源保护区^[16],这有助于光倒刺鲃种质资源的保护。

3.1.2 群体间的遗传分化。光倒刺鲃的遗传分化水平分析显示,东江与其他群体间遗传分化指数较高。系统发育分析显示,东江水系样本与北江、赣江和九龙江水系的部分样本组成了独立的分支 I。东江除了与北江、赣江以及九龙江部分个体关系较近外,与其他群体亲缘关系较远,单倍型间的变异达到 16 步以上。结果表明,东江群体与其他群体之间存在较明显的遗传分化,同时与北江、赣江和九龙江部分个体间的遗传关系也较近。Yang 等^[17]在对银鲷(*Squalidus argentatus*)的研究发现,东江、韩江与九龙江群体为一个单系群,与华南地区其他群体不同,这与该研究的结果相似。从地理分布上看,东江被狮子洋与北江和西江隔离。在间冰期时由于海平面上升,东江与北江隔离,光倒刺鲃作为溪流鱼类难以进行基因交流,使得东江群体与北江、西江群体发生了分化,而这 3 条河流在冰期海平面大幅下降时又发生了汇聚^[18-19],使得东江与北江的群体得以交流。另一方面,东江水系群体与赣江水系和九龙江群体的部分个体关系较近。这可能由于东江水系与赣江水系紧邻,水系间的袭夺及连接事件使得 2 个水系部分个体存在较近的亲缘关系;九龙江水系群体部分个体可能由东江群体扩散而来,而随着华南大陆东部莲花山脉的隆起,进而阻隔了两者间的遗传交流。东江群体与其流域两侧水系的群体既存在一定程度的隔离,又存在着基因交流。这种较为独特的鱼类遗传分化格局,可从其鱼类组成特征得到印证。东江水系既有其特有的鱼类,如三线拟鲃(*Pseudobagrus trilineatus*)、白线纹胸鲃(*Glyptothorax pallozonum*)等^[20-21],又有珠江水系特有鱼类,如沙花鳅(*Cobitis arenae*)^[22]、北江光唇鱼^[23]等,还有与韩江及九龙江等水系共同特有的鱼类,如裸腹原缨口鳅(*Vanmanenia gymnetrus*)^[21]、带刺光唇鱼(*Acrossocheilus spinifer*)^[24]等。

该研究的系统树与单倍型网络图分析表明,光倒刺鲃的珠江与长江水系的群体分别位于不同分支,说明它们之间存在一定的遗传分化。笔者对光倒刺鲃形态研究发现,珠江水系群体与长江、钱塘江等水系的群体在体色、体型等性状上存在着一定差异,珠江群体的特点为体青绿色,腹鳍及臀鳍金黄色,体型较高等;长江、钱塘江等的特点为体青灰色,腹鳍及臀鳍红色,体型较长等。造成这些差异的原因可能是南岭的隆起^[25],限制了其南北两侧水系群体的基因交流,经过长期的性状差异积累,使得南岭两侧的群体产生了一定程度的遗传分化。因而,复杂的地形地貌可能导致光倒刺鲃形成了较明显的地理差异,对应群体应分别作为独立管理单元进行保护利用。

3.2 结论 该研究对 9 个群体光倒刺鲃的 209 条 COI 基因

研究表明,光倒刺鲃群体的遗传多样性总体偏低,应加强对其种质资源的保护;东江水系与其他群体既存在一定隔离,又存在着基因交流,同时珠江水系群体与长江水系等群体间具有分化明显,地形地貌的衍化对光倒刺鲃种群分化产生一定影响。

参考文献

- [1] 刘云国.水产生物 DNA 分子标记技术[M].北京:科学出版社,2009:59-62.
- [2] 毕相东,杨雷,侯俊利,等.COI基因在海洋动物分子系统学研究中的应用[J].水产科学,2008,27(2):105-108.
- [3] 张凤英,马凌波,施兆鸿,等.3种鲃属鱼类线粒体 COI 基因序列变异及系统进化[J].中国水产科学,2008,15(3):392-399.
- [4] 乐佩琦.中国动物志:硬骨鱼纲 鲃形目(下卷)[M].北京:科学出版社,2000:38-41.
- [5] 中国水产科学研究院珠江水产研究所,华南师范大学,暨南大学,等.广东淡水鱼类志[M].广州:广东科技出版社,1991:140-141.
- [6] 黄种持,黄柳婷,林学文,等.黑脊倒刺鲃线粒体 DNA 多样性分析[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2008,38(2):259-262,220.
- [7] 蓝昭军,李强,舒晓,等.基于线粒体细胞色素 b 基因的光倒刺鲃遗传多样性与遗传结构研究[J].海洋与湖沼,2016,47(6):1158-1165.
- [8] 唐琼英,杨秀平,刘焕章.刺鲃基于线粒体细胞色素 b 基因的生物学地理过程[J].水生生物学报,2003,27(4):352-356.
- [9] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, 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.
- [10] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [11] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary bioinformatics online, 2007, 1: 47-50.
- [12] 胡静,侯新远,尹绍武,等.基于 mtDNA COI 和 Cytb 基因序列对南中国海不同海域波纹唇鱼群体遗传多样性的研究[J].水生生物学报, 2014, 38(6): 1008-1016.
- [13] LIU Y H, ZHANG M H. Population genetic diversity of roe deer (*Capreolus pygargus*) in mountains of Heilongjiang Province[J]. Zoological research, 2009, 30(2): 113-120.
- [14] 张宏,赵良杰,胡忠军,等.千岛湖和长江黄尾鲴种群的遗传变异研究[J].上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 12-19.
- [15] 刘军,赵良杰,刘其根,等.不同水系银鲴自然群体线粒体 COI 基因遗传变异研究[J].淡水渔业, 2015, 45(6): 3-8, 21.
- [16] 罗刚,张胜茂,邹国华.国家重点保护经济水生动植物图谱[M].北京:中国农业出版社,2017.
- [17] YANG J Q, TANG W Q, LIAO T Y, et al. Phylogeographical analysis on *Squalidus argentatus* recapitulates historical landscapes and drainage evolution on the island of Taiwan and mainland China[J]. International journal of molecular sciences, 2012, 13(2): 1405-1425.
- [18] WANG L, SARNTHEIN M, ERLLENKEUSER H, et al. East Asian monsoon climate during the Late Pleistocene: High-resolution sediment records from the South China Sea[J]. Marine geology, 1999, 156(1/2/3/4): 245-284.
- [19] LIU Z F, TRENTESAUX A, CLEMENS S C, et al. Clay mineral assemblages in the northern South China Sea: Implications for East Asian monsoon evolution over the past 2 million years[J]. Marine geology, 2003, 201(1/2/3): 133-146.
- [20] 褚新洛,郑葆珊,戴定远.中国动物志:硬骨鱼纲 鲃形目[M].北京:科学出版社,1999:51-68.
- [21] 叶富良,杨萍,宋蓓玲.东江鱼类区系研究[J].湛江水产学院学报, 1991, 11(2): 1-7.
- [22] 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.
- [23] 林小涛,张浩.东江鱼类生态及原色图谱[M].北京:中国环境科学出版社,2013:109-120.
- [24] 蓝昭军,黄小林,赵俊.珠江水系鱼类一新纪录——带刺光唇鱼(鲤形目:鲤科)[J].动物学杂志, 2015, 50(3): 390-395.
- [25] 地质矿产部《南岭项目》构造专题组.南岭区域构造特征及控岩控矿构造研究[M].北京:地质出版社,1988.