

文章编号: 1674 - 5566(2012)02 - 0176 - 07

稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区的结构及遗传多样性

冉光鑫, 代应贵, 岳晓炯

(贵州大学 动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 采用 PCR 扩增和 DNA 直接测序技术, 测定分析了采自珠江水系西江的 30 尾稀有白甲鱼 (*Onychostoma rara*) mtDNA D 环约 467 bp 的序列。结果显示, 该序列的长度为 467 ~ 470 bp, 共计发现了 16 个变异位点, 占分析总位点数的 3.40%, 其碱基组成 A + T 的平均含量 (67.6%) 高于 C + T (32.3%)。稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区在结构上可分为终止序列区、中央保守区和保守序列区, 存在着与终止相关的序列 ETAS 以及保守序列 CSB-F、CSB-E、CSB-D 和 CSB1。定义了 11 种单倍型, 单倍型多样性指数 (H_d) 为 0.733 3, 单倍型之间平均遗传距离 (P) 为 0.010 2, 核苷酸多样性 (P_i) 为 0.005 79, 平均核苷酸差异数 (K) 为 2.705 75。11 个单倍型构建的非加权分群平均法 (UPGMA) 系统树聚为 2 个分支。该研究表明稀有白甲鱼西江种群存在着较丰富的遗传多样性。

研究亮点: (1) 有关濒危鱼类稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环测序及遗传多样性研究尚未见报道; (2) 本研究揭示了稀有白甲鱼西江种群尚保存有较丰富的遗传多样性; (3) 对稀有白甲鱼西江种群遗传学研究具有理论价值, 并对开展该种群的保护和资源利用具有现实指导意义。

关键词: 稀有白甲鱼; mtDNA; D 环; 遗传多样性; 西江

中图分类号: S 917

文献标志码: A

鱼类线粒体 DNA 作为一种分子标记已被广泛应用于探讨鱼类进化关系及其系统学研究^[1-4]。线粒体 DNA 中的控制区是一段非编码区, 不编码蛋白质, 由于受到选择压力小而在进化过程中积累了较多的突变, 如碱基替换、缺失以及插入等, 被认为是线粒体基因组中进化最快的部分^[5-6]。控制区序列分析在研究种群遗传多样性、种内遗传进化、物种保护及地质演化中具有重要意义^[7]。

稀有白甲鱼 (*Onychostoma rara*) 属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae) 白甲鱼属 (*Onychostoma*), 分布于我国长江中游沅江水系和西江水系^[8], 是当地重要的野生经济鱼类。近年来, 由于酷渔滥捕, 加上栖息环境的破坏, 稀有白甲鱼资源日趋枯竭, 现已被列为濒危鱼类^[9]。

迄今, 有关稀有白甲鱼 mtDNA 控制区序列多样性仅见于对沅江水系稀有白甲鱼的报道^[10], 尚未见对稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 控制区遗传多样性的报道。本文通过对稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 控制区序列进行扩增和测序, 分析该种群 mtDNA 控制区的序列变异及遗传多样性, 以期对稀有白甲鱼西江种群的保护提供科学依据和基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

稀有白甲鱼样品于 2010 年 10 - 12 月采自珠江西江水系。随机采集了共计 30 尾活鱼个体进行解剖, 各自取肌肉 3 ~ 5 g 用乙醇浸泡保存。带回实验室后存放于 -20 °C 冰箱中, 备用。标本鉴定参照陈宜瑜等^[11]的方法进行。

收稿日期: 2011-07-21 修回日期: 2011-10-31

基金项目: 国家自然科学基金 (30760189, 30960297); 贵州省科学技术基金 [黔科合 J 字 (2007) 2062]; 贵州省省长基金 [黔省专合字 (2005) 347]

作者简介: 冉光鑫 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种与种质资源学。E-mail: guangxinr@163.com

通讯作者: 代应贵, E-mail: daiygui@163.com

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取

按照北京天根生化科技有限公司提供的 DNA 提取试剂盒提供的方法,提取总 DNA,4 °C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增

利用引物^[12]L16521;5'-tcaccctggtcccaagccag-3'和 H427;5'-tgcataaaaagaatgceggcatg-3'对 mtDNA D 环约 500 bp 碱基进行扩增。PCR 扩增反应总体积为 25 μ L,含 2 \times Master Mix 12.5 μ L、引物 5 μ L、ddH₂O 6.5 μ L 及模板 1 μ L。PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min;35 个循环包括:94 °C 变性 40 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

1.2.3 PCR 产物纯化及目的片段的测序

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,用 DNA 纯化试剂盒纯化目的片段。将目的片段送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.4 序列分析

采用 Clustal X 2.0 软件对所测的稀有白甲鱼 mtDNA D 环序列进行对比分析。用 MEGA 5.0 软件中的 Kimura 双参数法计算单倍型之间的遗传距离,并构建系统树。用 DNASP 4.5 计算遗传多样性参数。

2 结果与分析

2.1 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环序列 PCR 扩增结果

以提取的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增稀有白甲鱼 mtDNA D 环基因,经琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),获得单一的目的 DNA 片段,目的条带清晰、明亮,特异性扩增产物大小约为 500 bp,未发现非特异性条带,空白对照未出现扩增产物,可以排除外源 DNA 干扰。

2.2 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区的结构

对比其它鱼类 mtDNA D 环区的结构^[13-15],稀有白甲鱼 mtDNA D 环区可分为终止序列区(terminal associated sequences, TAS)、中央保守区(central conserved domain, CD)以及保守序列区(conserved sequence block, CSB)3 个区域(图 2)。在终止序列区,成功识别了一个与终止相关的序列 (ETAS): TACATACACATGTAATCTT-

CAGTAATGTATT(“-”表示发生变异的碱基,即转换、颠换或缺失,下同)。在中央保守区,存在着 3 个中央保守序列,即 CSB-F、CSB-E 和 CSB-D,其核心识别序列分别为 ATGTAGTAAGAAACCACC, A-GACAATAACTGTGGGGG, TATTACTGGCATCTG。在保守序列区仅发现一个保守序列 CSB1:ATAACTGT-ATAT-。

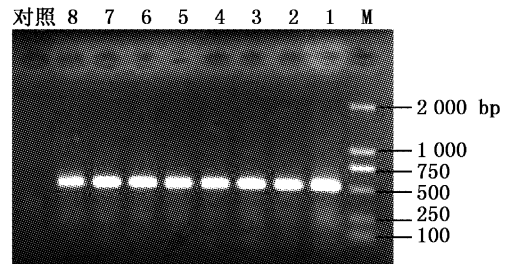


图 1 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环部分序列扩增电泳图

Fig. 1 PCR result of mtDNA D-loop partial sequence in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River

M 为 DNA 分子量标准;泳道 1-8 为 8 个样品。

```
GACACCATTATGGTTTAAETASTACATACACATGTAATCTT-CAGTAATGTATTGTACTT 60
ATGTAATATCAACCACTCATTATTTTAAACCATAAAGCAAGTACTAAATATCAAGCTATAC 120
ATAAAGCATAAACATTAAGACTCACAAATACTACTATCTTAACTTGGGTAATAGATTATC 180
CCTAAAAATTGACCTCAGATTTTTCCTTGAATAATCAACTAAAATCCCATTAACCCAT 240
TTTAAATGTAGTAAGAAACCACCAACCAATTTAATTAAGGTATATCATGCATGATAGAAT 300
CAA-GACAATAACTGTGGGGGTTGCACAATATGAACTATTACTGGCATCTGTTCTTATT 360
TCAGGAACATAACTCT-ATAT-CCATCCTCGGATAACTATACTGGCATTGTAATGCT 420
GTAATACATATGTCTGTTACCCACCATGCCGCATCTTTT-ATA-TGC 470
```

图 2 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环序列

Fig. 2 The sequence of mtDNA D-loop in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River

2.3 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环序列特征及多态性

实验扩增并测定的共计 30 尾稀有白甲鱼个体中 mtDNA D 环序列长度为 467 ~ 470 bp(除去引物及部分端部序列)。该序列长度碱基 A、T、C、G 平均含量分别为 35.3%、32.4%、19.5%、12.8%。AT 含量(67.7%)高于 GC 含量(32.3%)。其中碱基 A 的含量最高,碱基 G 的含量最低。共计发现了 16 个变异位点,分别为 39、58、59、77、110、129、162、183、225、273、304、354、377、382、397 和 435,变异位点数占总位点数的 3.40%(表 1)。其中简约信息位点(parsimony informative sites)9 个,位置为 39、58、59、129、225、

273、304、382 和 435。单变异位点 (singleton variable sites) 7 个, 位置为 77、110、162、183、354、377 和 397, 转换位点 15 个, 包括 A-G 转换位点 225、304 和 377 及 C-T 转换位点 39、58、59、77、110、129、162、183、273、354、397 和 435; 出现 1 个位点(382)同时存在转换与颠换(A-T)。转换位点数明显高于颠换位点, 转换位点数与颠换位点

数比值(TS/TV)为 16/1。

DNASP 软件分析显示, 30 个稀有白甲鱼个体 mtDNA D 环 16 个变异位点分属 11 个单倍型。其中以单倍型 2 (Hap2) 个体数最多, 达 15 个。其次, 单倍型 6 (Hap6) 包含 5 个个体, 单倍型 8 (Hap8) 包含 2 个个体, 其余单倍型均为 1 个个体。

表 1 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环序列的变异位点及单倍型

Tab. 1 Variable loci and haplotypes of mtDNA D-loop in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River

单倍型	变异位点																个体数	登录号
	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4				
	3	5	5	7	1	2	6	8	2	7	0	5	7	8	9	3		
	9	8	9	7	0	9	2	3	5	3	4	4	7	2	7	5		
Hap1	T	C	T	T	T	T	C	T	A	T	G	T	A	T	C	T	1	JN133505
Hap2	-	T	C	-	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	-	-	15	JN133506
Hap3	-	T	C	-	-	-	-	C	-	C	-	-	G	A	-	-	1	JN133507
Hap4	-	T	C	-	-	C	-	C	-	-	-	C	-	-	T	-	1	JN133508
Hap5	-	T	C	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	C	-	-	1	JN133509
Hap6	-	T	C	-	-	C	-	C	-	C	-	-	-	A	-	-	5	JN133510
Hap7	-	-	C	-	-	-	T	C	-	C	-	-	-	-	-	-	1	JN133511
Hap8	-	-	C	-	-	-	-	C	-	C	A	-	-	-	-	C	2	JN133512
Hap9	-	-	C	-	C	-	-	C	G	C	-	-	-	C	-	-	1	JN133513
Hap10	C	-	C	-	-	-	-	C	G	C	-	-	-	-	-	-	1	JN133514
Hap11	C	-	-	C	-	-	-	C	G	C	-	-	-	-	-	-	1	JN133515

注: - 表示与 Hap1 相同的碱基。

2.4 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环序列的遗传多样性及 UPGMA 分子系统树

利用 DNASP 软件计算了稀有白甲鱼 30 个个体 mtDNA D 环序列的遗传多样性参数。结果显示, 多态位点数(S)为 16, 单倍型个数(H)为 11, 单倍型多样性指数(H_d)为 0.733 3, 核苷酸多样性(P_i)为 0.005 79, 平均核苷酸差异数(K)为 2.705 75(表 2)。

表 2 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 多样性

Tab. 2 MtDNA diversity in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River

遗传多样性指数	数值
多态性位点数(S)	16
单倍型(H)	11
单倍型多样性指数(H _d)	0.733 3
核苷酸多样性指数(P _i)	0.005 79
平均核苷酸差异数(K)	2.705 75

应用 Mega 软件, 根据线粒体 D 环序列计算了 11 个单倍型之间的 Kimura 2-parameter model 遗传距离(表 3)。从表 3 可知, (1) 11 个单倍型中任意 2 个单倍型之间的遗传距离均不为 0, 即任意 2 个单倍型之间核苷酸序列均不完全相同。(2) 单倍型之间最大遗传距离为 0.019 7, 最小遗传距离为 0.002 1。(3) 单倍型的平均遗传距离为 0.010 2。

从 GenBank 中下载长臂鲃 (*Mystacoleucus marainatus*) 的同源序列 (GenBank 登录号: AF498825) 并以其作为外群, 根据遗传距离构建了稀有白甲鱼西江种群单倍型的 UPGMA 分子系统树(图 3)。结果显示, 11 个单倍型聚为 2 个分支。其中一个分支包括 6 个单倍型, 代表 7 个个体; 另一分支包括 5 个单倍型, 代表 23 个个体。

表 3 稀有白甲鱼西江种群单倍型间的遗传距离(左下角为遗传距离,右上角为标准误)
 Tab. 3 Genetic distances(lower-left) and SE(upper-right) between mtDNA haplotypes
 in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River

单倍型	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10	Hap11
Hap1		0.005 2	0.004 9	0.005 1	0.004 6	0.005 2	0.004 4	0.004 9	0.005 3	0.004 8	0.004 7
Hap2	0.013 0		0.003 6	0.004 0	0.002 2	0.002 0	0.004 3	0.004 7	0.004 2	0.004 8	0.005 4
Hap3	0.013 0	0.006 5		0.004 8	0.002 8	0.003 0	0.004 2	0.004 6	0.004 5	0.004 5	0.005 3
Hap4	0.013 0	0.008 6	0.013 0		0.004 6	0.004 0	0.005 0	0.005 4	0.005 8	0.005 4	0.006 0
Hap5	0.010 8	0.002 1	0.004 3	0.010 8		0.003 0	0.003 7	0.004 2	0.003 5	0.004 1	0.004 9
Hap6	0.013 0	0.002 1	0.004 3	0.008 6	0.004 3		0.004 3	0.004 7	0.004 7	0.004 8	0.005 4
Hap7	0.008 6	0.008 6	0.008 6	0.013 0	0.006 5	0.008 6		0.003 7	0.004 1	0.003 7	0.004 6
Hap8	0.010 8	0.010 8	0.010 8	0.015 2	0.008 6	0.010 8	0.006 5		0.004 6	0.004 1	0.005 1
Hap9	0.013 0	0.008 6	0.010 8	0.017 4	0.006 5	0.010 8	0.008 6	0.010 8		0.003 4	0.004 6
Hap10	0.010 8	0.010 8	0.010 8	0.015 2	0.008 6	0.010 8	0.006 5	0.008 6	0.006 5		0.003 0
Hap11	0.010 8	0.015 2	0.015 2	0.019 7	0.013 0	0.015 2	0.010 8	0.013 0	0.010 8	0.004 3	

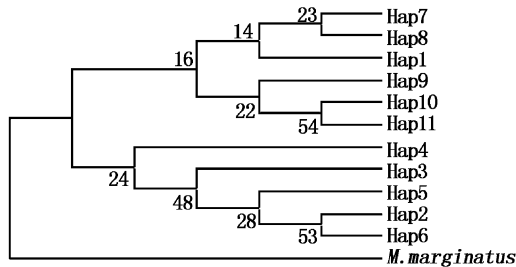


图 3 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 单倍型
 UPGMA 分子系统树

Fig. 3 The UPGMA phylogenetic tree of mtDNA
 haplotypes in the population of
Onychostoma rara from the Xijiang River

树枝处的数字为 Bootstrap 值,重复次数为 1 000 次; Haps1 - 11 代表不同的单倍型。

3 讨论

3.1 稀有白甲鱼西江种群 mtDNA D 环区的结构特点及序列变异

mtDNA D 环的主要功能与该区域一些功能单元相关,而这些功能单元又与 mtDNA 的复制、终止、转录相关^[16]。同时,mtDNA D 环功能单元还包含较多的系统发育信息,可以用于种属以上阶元间的系统发育分析^[17]。因此研究 mtDNA D 环区的结构对于鱼类系统学、地理种群识别、内群起源以及地理分化等具有重要意义^[18]。通过与其它鱼类对比,本研究在稀有白甲鱼 mtDNA D 环终止序列区、中央保守区和保守序列区成功识别了一系列功能保守序列,包括 ETAS、CSB-F、CSB-E、CSB-D 及 CSB1。其中,存在于 ETAS 中的

核心序列 TACAT 与其互补序列 ATGTA 可形成稳定的发夹结构。在 ETAS 中,还发现了 TACAT 的重复序列,可能是终止序列复制后发生变异的结果。此外,在 CSB-E 中,存在着一个 GTGGG-box。进行稀有白甲鱼 mtDNA D 环区结构分析不但有利于深入了解该区域结构与功能的特点,而且对今后开展稀有白甲鱼系统发育的研究也具有重要的意义。

本文对 30 个个体稀有白甲鱼 mtDNA D 环序列测序约为 467 bp,其碱基 A、T、C 碱基含量偏高,G 含量偏低,A + T 含量(67.6%)高于 G + C(32.3%),这与其它鱼类 mtDNA 控制区碱基组成相似^[17,19-20]。

一般认为,D 环是线粒体基因组上进化最快的部分,它的变异速率约为 mtDNA 完整分子或 mtDNA 分子其他区域的 5 ~ 10 倍^[21]。对稀有白甲鱼 mtDNA 控制区分析共计发现 16 个多态变异位点,其中 15 个转换位点,同时存在 1 个转换与颠换位点,转换颠换比(TS/TV)为 16/1,偏大。这说明 mtDNA 控制区的变异更多的是发生在嘌呤与嘌呤或者嘧啶与嘧啶之间,而嘌呤与嘧啶或嘧啶与嘌呤之间的颠换则发生的相对较少,即转换的发生率高于颠换。分析原因可能是具有高比例的 A + T^[22]。而在线粒体基因组 DNA 进化过程中,通常发生转换的频率高于颠换^[23]。稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 控制区的这一替换规律与鱼类 mtDNA 控制区通常发生转换的频率高于颠换的规律是一致的。

3.2 稀有白甲鱼西江种群的遗传多样性

鱼类遗传多样性是鱼类生物多样性的重要

组成部分,其衡量了生物携带遗传信息的变异程度。作为遗传信息载体的 DNA,其变化直接反映了物种遗传变异的程度。群体遗传多样性的损失,对物种有着重要的影响,而群体遗传多样性每损失 10%,就会对其繁殖能力、存活率、生长等重要生理性状产生极大的负面影响^[24]。因此,遗传多样性的丰富性,对于一个种群延续与发展具有重要的意义。在 mtDNA 遗传多样性的研究中,单倍型的平均遗传距离(P)和核苷酸多样性(P_i)通常是衡量一个种群遗传变异及遗传多样性的两个重要指标^[25]。该实验中,稀有白甲鱼单倍型平均遗传距离为 0.010 2,大于 0.01^[26],说明稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 变异较大,遗传多样性较高。核苷酸多样性是指群体内任意两个个体 mtDNA 序列每个位点的平均核苷酸差异数,其大小反映了遗传多样性程度的高低。 P_i 值较高则说明遗传多样性较高,反之亦然。已有研究表明,当核苷酸多样性 P_i 值在 0.001 5 ~ 0.004 7 时,其种群的遗传多样性较低^[26]。本研究中,稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 核苷酸多样性 P_i 值较大,为 0.005 79,大于雅鲁藏布江黑斑原鲃 (*Glyptosternon maculaton*) 谢通门群体 (0.002 08)^[27],与都柳江小口白甲鱼 (*Onychostoma lini*) 种群 (0.005 75)^[28] 相当。可见,稀有白甲鱼西江种群存在着较丰富的遗传多样性。

通过 30 个个体的 D 环序列构建的 UPGMA 分子系统拓扑结构表明,30 个个体分为两大分支 (图 2)。由于线粒体 DNA 表现为母系遗传,其种内遗传多样性可以探讨母系演化的历程^[29]。由此可以初步推断该种群 30 个个体可能来源于两个不同的母系祖先。当然,此结论尚需与核 DNA 标记结合起来分析后才能进一步确定。因为 mtDNA 多样性水平与种群数量和核基因多样性水平并不一定呈正相关^[30]。

3.3 稀有白甲鱼西江种群与沅江种群 mtDNA 序列及多样性的比较分析

彭珊和代应贵^[10]对稀有白甲鱼沅江种群 mtDNA 控制区进行了序列分析,从该种群 30 个稀有白甲鱼个体获得了 18 个单倍型。本文对稀有白甲鱼西江种群 mtDNA 控制区序列分析显示,该种群 30 个稀有白甲鱼个体分属 11 个单倍型。用相同的引物,从两个地理种群 mtDNA 控制区扩

增出来的序列长度基本一致,均约为 500 bp。两者的核苷酸组成也相似,均为 A + T 含量高于 C + G 含量,转换位点数均高于颠换位点数。然而,西江种群的单倍型平均遗传距离 P (0.010 2)、单倍型多样性指数 H_d (0.733 3)、核苷酸多样性 P_i (0.005 79)、平均核苷酸差异数 K (2.705 75) 均分别小于沅江种群 (0.014、0.940、0.010 7、5.092),这表明稀有白甲鱼西江种群遗传多样性较沅江种群低。造成两个种群遗传多样性不同的原因可能是由于长期的地理隔离,阻断了种群间的基因交流,同时因其生存环境的不同,导致其进化突变的差异,因为地理隔离会对群体间产生一定的遗传分化^[31]。

稀有白甲鱼西江种群与沅江种群均具有较高的单倍型多样性 H_d (0.733 3 ~ 0.940)。已有研究显示,种群内能够维持较高单倍型多样性的可能原因存在于较大的种群数量、环境的不均性或者具有适应种群快速增长的生活特性^[32]。同时,该两个地理种群 mtDNA 控制区核苷酸多样性 P_i 也较高 (0.005 79 ~ 0.010 7)。GRANT 和 BOWEN^[33]根据种群单倍型多样性和核苷酸多样性之间的关系推测了种群可能发生的扩张事件,并将种群的扩张事件分为 4 种类型:(1)低的单倍型多样性 H_d 和低的核苷酸多样性 P_i ($H_d < 0.5, P_i < 0.5\%$) 表明种群最近发生了瓶颈效应或由单一、少数系群发生了创立者效应 (founder effect); (2)高的单倍型多样性 H_d 和低的核苷酸多样性 P_i ,属于瓶颈效应后伴随着迅速的种群成长与突变的积累;(3)低的单倍型多样性 H_d 和高核苷酸多样性 P_i ,可能来自于两个独立种群发生了二次接触,或一个大而稳定的群中发生了瓶颈效应;(4)高的单倍型多样性 H_d 和高的核苷酸多样性 P_i ,说明该种群可能由一个大而稳定的种群经过长时间演化所产生或由两个不同系群的种群二次接触所形成。稀有白甲鱼西江种群与沅江种群应属于第 4 种类型,即在历史上该两个种群均具有较大的种群数量,这是其维持各自较高遗传多样性的基础。

3.4 稀有白甲鱼西江种群遗传多样性的保护

我国既是生物多样性特别丰富的国家,又是生物多样性受到严重威胁的国家之一^[34]。我国生物遗传多样性的保护,近年来受到了严峻的考验。遗传多样性是指同一物种的不同地理种群

或生态种群及其变异个体在遗传基因上的一致性和差异,即同一物种不同个体间基因的多样性^[35]。种群的遗传多样性水平越高,说明其在栖息环境的生存能力及对环境变迁的适应能力越强,有利于种群延续发展。反之,对环境的适应能力越弱,在长期进化过程中被淘汰的可能性越大。遗传多样性的贫乏,会对物种的生存、进化及种质资源的保护与利用带来诸多负面影响^[36]。近年来,由于栖息地的破坏,水域生态环境的退化及过度捕捞,稀有白甲鱼野生资源已濒临枯竭,现已被列为濒危鱼类^[9]。本研究中,尽管稀有白甲鱼西江种群目前尚保存着较为丰富的遗传多样性,而作为濒危鱼类为避免其出现遗传多样性的丧失或“瓶颈效应”,开展对稀有白甲鱼西江种群的保护和恢复显得刻不容缓。为此,必须采取措施开展对稀有白甲鱼西江种群及其遗传多样性的保护。

感谢贵州大学动物科学学院曾智勇副教授及硕士研究生向智龙、周莉对 PCR 实验的指导与帮助!

参考文献:

- [1] TZENG C S, HUI C F, SHEN S C, et al. The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variation among vertebrates [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(18): 4853 - 4854.
- [2] CHANG Y S, HUANG F L, LO T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1994, 38(2): 138 - 155.
- [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] 杨金权, 刘焕章. 两种鲮科鱼类在长江和珠江流域 Cytb 基因序列变异性分析 [J]. *水生生物学报*, 2003, 27(3): 253 - 257.
- [5] AVISE J C. Gene tree and organismal histories: a phylogenetic approach to population [J]. *Evolution*, 1989, 43(6): 1192 - 1208.
- [6] ROSEL P E, HAYGOOD M G, PERRIN W F. Phylogenetic relationship among the true porpoise (Cetacean: phocoenidae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1995, 4(4): 463 - 474.
- [7] 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.
- [8] 单向红, 林人端, 乐佩琦, 等. 白甲鱼属 [M]//乐佩琦. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(下卷). 北京: 科学出版社, 2000: 126 - 147.
- [9] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录(第一卷): 红色名录 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 160.
- [10] 彭珊, 代应贵. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性 [J]. *水产学报*, 2009, 33(2): 196 - 200.
- [11] 陈宜瑜, 李峰, 李思忠, 等. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(中卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 325 - 327.
- [12] KONG Q P, YAO Y G, HUANG S Y. Mitochondrial DNA control region and cytochrome b sequence variation in the genus *Mystacoleucus* Ünther (Pisces: Cyprinidae: Barbiniae) from China [J]. *Biochemical Genetics*, 2003, 41(9): 305 - 313.
- [13] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构和进化: 以鲮鱼类为例 [J]. *自然科学进展*, 2002, 12(3): 266 - 270.
- [14] 杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鳊白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析 [J]. 2008, 29(4): 379 - 385.
- [15] LEE W J, CONROY J, HOWELL W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 41(1): 54 - 66.
- [16] 曾青兰, 刘焕章. 大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区序列的研究 [J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2001, 23(3): 261 - 264.
- [17] 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.
- [18] 刘红艳, 余来宁, 张繁荣. 鱼类线粒体 DNA 控制区的分子结构及应用进展 [J]. *水利渔业*, 2008, 28(2): 4 - 8.
- [19] 朱彩艳, 江世贵, 张殿昌, 等. 鲮原种群体的 D-loop 序列分析 [J]. *南方水产*, 2008, 4(1): 32 - 35.
- [20] 马波, 姜作发, 霍堂斌. 基于线粒体 DNA 控制区序列变异探讨黑龙江和图们江细鳞鲑属鱼类的分类地位 [J]. *动物分类学报*, 2009, 34(3): 499 - 506.
- [21] BROWN W M. The mitochondrial genome of animals [M]// *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum Press, 1985: 95 - 130.
- [22] 诸廷俊, 杨金权, 唐文乔. 长江口鲮属鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(2): 152 - 157.
- [23] LOFTUS R T, MACHUGH D E, BRADLEY D G, et al. Evidence for two independent domestications in cattle [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 1994, 91(7): 2757 - 2761.
- [24] ALLENDORF F W, RYMAN N, UTTER F. Genetic management of hatchery stock [M]// *Population genetics and fishery management*. Seattle: University of Washington Press, 1987: 141 - 159.
- [25] NEIGEL J E, AVISE J C. Application of a Random Walk Model to Geographic Distributions of Animal Mitochondrial DNA Variation [J]. *Genetics*, 1993, 135(4): 1209 - 1220.
- [26] LAN H, SHI L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: An approach from mitochondrial DNA Polymorphism [J]. *Biochemical Genetics*, 1993, 31(1): 51 - 60.
- [27] 薛芹. 黑斑原鲮线粒体 DNA 序列的遗传多样性研究 [D].

- 武汉:华中农业大学,2005.
- [28] 代应贵,韩雪,张晓杰.小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环的序列变异及遗传多样性[J]. 动物学杂志,2010,45(2):115-120.
- [29] 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 Phylogenetic and Evolution, 2004, 31(2):440-448.
- [30] 王静波,胡长龙,徐宏发. 线粒体 DNA (mtDNA) 多态性在动物保护生物学中的应用[J]. 生物多样性, 2001, 9(2): 181-187.
- [31] 赵丽丽,赵金良,曹阳. 闽江和漓江暗鰻 mtDNA 控制区序列差异分析[J]. 动物学杂志, 2007, 42(1):54-58.
- [32] NEI M. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987:1-89.
- [33] GRANT W S, BOWEN B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. The Journal of Heredity, 1998, 89:415-426.
- [34] 陈灵芝. 中国的生物多样性: 现状及其保护对象[M]. 北京: 科学出版社, 1993:241.
- [35] 喻庆国. 生物多样性调查与评价[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2007:2-3.
- [36] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999:1-3.

Structure and genetic diversity of mtDNA D-loop in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River

RAN Guang-xin, DAI Ying-gui, YUE Xiao-tong

(College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: The genetic diversity of mtDNA D-loop in the population of *Onychostoma rara* from the Xijiang River, the Pearl River system was studied for the first time on the basis of determination of about 467 bp sequences of mtDNA D-loop in 30 individuals by the methods of PCR and DNA sequencing. The results showed that the length of the determined sequence in 30 individuals varied from 467 to 470 bp. A total of 16 variable loci (3.40% of total loci) were detected in the sequence of mtDNA D-loop in the population, and the total percentage of bases A and T (67.6%) was much higher than that of bases C and G (32.3%) in the sequence. The mtDNA D-loop of *Onychostoma rara* comprised the termination associated sequence domain, the central conserved sequence domain and the conserved sequence block domain, and the extended termination associated sequence (ETAS), 3 conserved blocks (CSB-F, CSB-E, CSB-D) in the central conserved sequence domain and 1 conserved sequence blocks (CSB1) in the conserved sequence block domain were successfully identified in the population. The 30 individuals belonged to 11 haplotypes according to the determined sequences. The haplotype diversity (H_d) was 0.733 3, and the average genetic distance (P) between the haplotypes of the population was 0.010 2. The nucleotide diversity (P_i) of the 30 individuals was 0.005 79, and the average number of nucleotide differences (K) of them was 2.705 75. The UPGMA phylogenetic tree of the 11 haplotypes comprised 2 branches. The population of *O. rara* from the Xijiang River possessed abundant genetic diversity.

Key words: *Onychostoma rara*; mtDNA; D-loop; genetic diversity; Xijiang River