

千岛湖大眼华鳊形态度量学和 D-loop 序列分析

赵良杰¹, 何光喜², 周小玉¹, 贾佩娇¹, 武震¹,
宋固¹, 张宏¹, 刘其根^{1*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 浙江杭州千岛湖发展有限公司, 浙江 淳安 311700)

摘要: 为了解千岛湖大眼华鳊不同地方群体的遗传分化, 以千岛湖大眼华鳊为材料, 通过形态度量学和分子生物学的方法对其进行了研究。形态变量的主成分分析(PCA)结果的散布图显示, 3 个群体的标本重叠在一起, 表明 3 个水域的大眼华鳊没有发生形态上的分化。通过对线粒体 D-loop 区的序列分析共发现了 27 个变异位点, 35 个单倍型。NJ 树和单倍型网络图均未显示出各群体有分化的趋势。3 个群体的平均碱基组成差异很小, 且 A + T 含量(64.82%) 高于 G + C 含量(35.18%), 各群体均表现出高单倍型多样性(h)和低核苷酸多样性(π)的特点, 汾口的遗传多样性最高($h = 0.968 \pm 0.018$, $\pi = 0.00476 \pm 0.00049$), 临岐次之($h = 0.968 \pm 0.017$, $\pi = 0.00453 \pm 0.00041$), 富文最低($h = 0.937 \pm 0.037$, $\pi = 0.00330 \pm 0.00035$)。各群体间均具有较强的基因流($N_m > 4$), 其中汾口和富文之间最强($N_m = 27.40$)。两两群体之间的遗传分化指数(F_{st})都呈现出不显著的轻度分化($F_{st} < 0.05$, $P > 0.05$)。主成分分析和线粒体序列分析综合表明, 千岛湖各水域的大眼华鳊属于一个随机交配群体。为了保护这一重要的渔业资源, 建议继续保持千岛湖大眼华鳊的基因流格局, 减少人为因素对该物种在库区活动的影响。

关键词: 大眼华鳊; 形态度量学; 主成分分析; D-loop; 千岛湖

中图分类号: Q 348; S 917.4

文献标志码: A

自 20 世纪 50 年代新安江水库(千岛湖)蓄水以来, 库区原有的河道和溪流被淹没, 取而代之的是水下环境复杂的深水水库。水体环境的改变, 必然对于鱼类的生存造成重大的影响^[1]。千岛湖库区水域呈一个英文字母 X 型, 除上游新安江来水外, 在千岛湖库区的汾口、富文、临岐 3 个方向各有一主要支流注入库区^[2], 3 个水头水域水体流速较快, 溶氧高, 饵料充足, 是天然鱼类重要的产卵和索饵区。许多类群也在这三个区域建立起各自的繁殖群体。

大眼华鳊(*Sinibrama macrops*)是千岛湖天然经济鱼类中产量最高的鱼类之一^[3], 它隶属于鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 华鳊属

(*Sinibrama*)。由于该种的定名目前国内尚存争议^[3](另一观点认为该种为伍氏华鳊^[4]), 我们依据张鸷等^[5]最新的研究结果, 将千岛湖的华鳊定名为大眼华鳊。由于千岛湖水体自然相通, 而这 3 个水头水域相距又很远, 大眼华鳊各种群之间是否发生分化尚不清楚。目前, 国内外针对同一水域鱼类的群体遗传研究也较多, 如对褐鳟(*Salmo trutta*)的研究表明在同一湖泊中这一鱼类出现了分化的种群^[6-7]; 孟玮等^[8]对额尔齐斯河银鲫的研究也发现两个群体发生了形态和分子水平上的分化; 而闵锐等^[9]对滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)的研究发现该种的 6 个群体并未发生形态学的分化。而先前关于大眼

收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-05-06

资助项目:国家自然科学基金项目(31072218)

通信作者:刘其根, E-mail: qgliu@shou.edu.cn

华鳊的研究,集中在生物学^[3,10]、分类学^[5,11]以及台湾大眼华鳊和大陆几个水系大眼华鳊的亲缘关系^[12]上,并未见有该种在同一水域遗传格局的研究。我们利用形态度量学和线粒体 D-loop 序列分析的方法,通过分析 3 个不同地方的大眼华鳊群体之间的形态和遗传差异,探讨千岛湖大眼华鳊群体间的种群动态和基因流,从而为了解定居性淡水鱼类在湖泊、水库中的散布和交流模式提供基础的参考资料,也为保护千岛湖大眼华鳊这一重要的渔业资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用大眼华鳊取自杭州千岛湖库区,进行形态测量的标本分别来自汾口(49尾)、富文(14尾)、临岐(52尾)(图1)3个距离较远的水源水域,均为2010年4月8日—2010年4月10日采集后运回浙江省杭州千岛湖发展有限公司水科所实验室进行现场测量。进行分子生物学实验的标本分别来自:汾口(28尾),采于2008年7月和2010年4月;富文(25尾),采于2010年6月;临岐(28尾),采于2008年7月。取新鲜肌肉组织样品保存于无水乙醇中,带回上海海洋大学实验室进行后续实验。

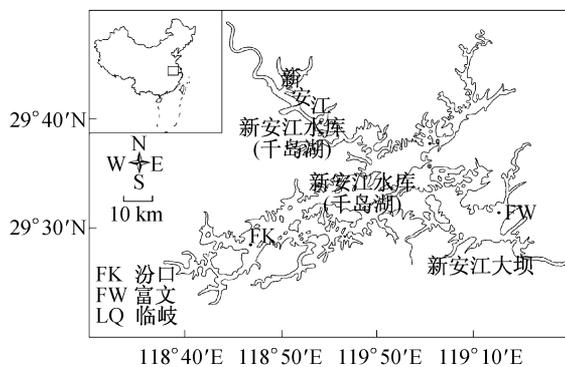


图1 千岛湖大眼华鳊采样图

Fig. 1 The sampling stations of *S. macrops* in Qiandaohu Lake

1.2 实验方法

形态度量学测定 参照谢仲桂等^[11]对华鳊属鱼类坐标点的选择,采用电子天平、数显游标卡尺及量鱼板对3个样点共计115尾大眼华鳊测量全长、叉长、体长、体高、体质量、头长、吻长、尾柄长、尾柄高、眼径、眼间距等11个可量性状及

AB、AC、BC、BD、BF、CD、CF、DF、DE、DG、EF、FG、EG、EH、EI、GH、GI、HI共18个框架数据。其中全长、叉长、体长精确度为1 mm,体质量精确度为0.1 g,其余数据精确度为0.1 mm(图2)。

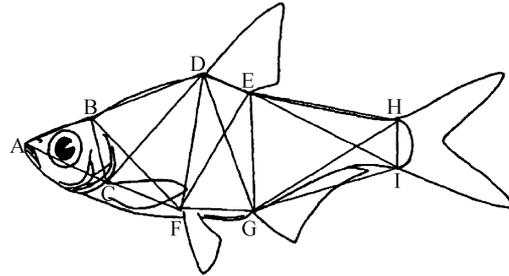


图2 大眼华鳊框架数据测量图(引自谢仲桂等^[11])

Fig. 2 Measurements of *S. macrops* (Xie et al^[11])

D-loop 序列测定 使用改进的酚氯仿法^[13]从肌肉组织中提取基因组DNA,溶于纯水中在-20℃冰箱中保存备用。使用引物DL1(ACC CCT GGC TCC CAA AGC)和DH2(ATC TTA GCA TCT TCA GTG)^[14]进行PCR扩增获得包含D-loop区的线粒体DNA片段。50 μL反应体系包括5.0 μL的10×buffer缓冲液,4.0 μL MgCl₂(25 mmol/L),4.0 μL dNTP,各1.0 μL的正反向引物,50~100 ng模板DNA,2 U Taq酶,灭菌ddH₂O补齐。PCR扩增反应的条件为94℃预变性2 min;40个循环,每个循环包括变性94℃30 s,退火50℃30 s,72℃延伸1.5 min;延伸72℃10 min;4℃保存^[14]。扩增产物的纯化和测序由上海生工生物有限公司完成。测序仪器为ABI3730,所测序列约为1 000 bp左右。

1.3 数据处理

主成分分析 为消除异速生长和体型差异带来的影响,对测量的数据进行对数转换(Log10)^[9,11,15],使用SPSS 18.0对数据进行标准化后,再依据其相关性矩阵提取主成分,并进行KMO和Bartlett检验,检验变量是否适合做因子分析^[9]。

D-loop 序列分析 使用DNASTAR ver. 7.1.0软件套装的SeqMan程序进行双向序列的手工拼接和校准。数据的读取和剪切采用MEGA 4.1^[16]中的ClustalW完成。碱基组成和可变位点数等在MEGA 4.1中分析获得,使用MEGA 4.1,基于Kimura-2参数模型,通过1 000次Bootstrap

检验,构建 NJ 树。使用 DnaSP 5.10^[17] 找出单倍型,通过 Network 4.6.1.0 软件构建单倍型网络图。使用 DnaSP 5.10 计算单倍型多样性(h)^[18]、核苷酸多样性(π)^[18-19]、种群间基因流 N_m ^[20]、遗传分化指数 F_{st} 以及净遗传距离 D_a 。

2 结果

2.1 形态学分析

将 29 个数据经对数转换和标准化后进行主

成分分析,主成分因子载荷和贡献率见表 1。从表中可以看出,前三个主成分累计贡献率为 77.090%,其中第一主成分贡献率为 68.145%,具有较大因子载荷的为叉长、头长、BC、BF、CD、DF、DG、EF、EH、EI、GH;第二主成分贡献率为 5.590%,具有较大因子载荷的是眼间距;第三主成分贡献率为 3.355%,具有较大因子载荷的是全长和尾柄长。

表 1 各测量性状的主成分因子载荷

Tab. 1 Morphometric characteristics and principal components extracted from examined materials

性状 characteristic	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
全长 total length	0.318	-0.069	0.586	0.702	0.215	-0.008	0.007
叉长 fork length	0.954	0.023	0.029	0.041	-0.098	0.029	-0.048
体长 standard length	0.759	-0.068	0.058	0.068	-0.267	0.327	0.212
体高 body depth	0.887	-0.167	0.037	-0.084	-0.026	-0.023	0.073
体质量 body weight	0.842	-0.062	0.082	-0.101	-0.028	0.003	0.075
头长 head length	0.901	0.064	-0.007	-0.115	0.057	0.050	-0.075
吻长 snout length	0.662	-0.544	-0.234	0.088	0.244	0.195	-0.005
尾柄长 caudal peduncle length	0.569	0.037	-0.538	0.483	-0.200	-0.145	-0.029
尾柄高 caudal peduncle depth	0.768	-0.309	-0.278	0.080	0.217	0.187	0.213
眼径 eye diameter	0.763	0.158	0.245	-0.120	0.038	0.289	-0.149
眼间距 interorbital width	0.252	0.890	-0.131	0.131	0.034	0.188	0.081
AB	0.830	0.183	0.021	-0.019	0.036	0.055	-0.123
AC	0.877	0.026	0.040	-0.125	0.132	-0.080	-0.262
BC	0.930	-0.040	-0.012	-0.078	0.088	0.015	-0.117
BD	0.854	-0.059	-0.003	-0.107	-0.038	-0.009	-0.076
BF	0.915	0.110	-0.077	0.029	0.057	-0.010	0.032
CD	0.908	-0.195	0.035	0.034	-0.090	-0.101	-0.044
CF	0.779	0.016	-0.149	0.036	0.204	-0.237	-0.138
DF	0.945	-0.078	0.034	-0.055	0.072	-0.056	0.110
DE	0.746	0.252	0.071	-0.136	0.234	-0.267	0.334
DG	0.941	-0.001	0.091	-0.132	-0.008	-0.079	0.000
EF	0.928	-0.159	-0.017	-0.010	-0.060	-0.002	0.083
FG	0.789	0.004	0.186	0.003	-0.252	-0.224	0.198
EG	0.892	-0.123	0.077	-0.054	-0.082	0.029	0.011
EH	0.914	-0.051	0.064	0.004	-0.222	0.015	-0.045
EI	0.929	0.035	0.039	-0.005	-0.141	-0.018	-0.049
GH	0.915	0.153	0.011	0.023	-0.023	-0.005	-0.115
GI	0.867	0.178	-0.125	0.213	-0.057	-0.024	-0.124
HI	0.803	0.327	-0.106	-0.069	0.181	0.064	0.124
贡献率/% variance	68.145	5.590	3.355	3.234	2.075	1.852	1.665
累积贡献率/% cumulative	68.145	73.735	77.090	80.325	82.400	84.252	85.917

利用因子得分根据 PC1 和 PC2、PC2 和 PC3 的主成分散点分布图(图 3,图 4),图中不同形状

的 3 点指示不同的地理群体,两图中各地理群体重叠分布,不同地理群体未自成区域。

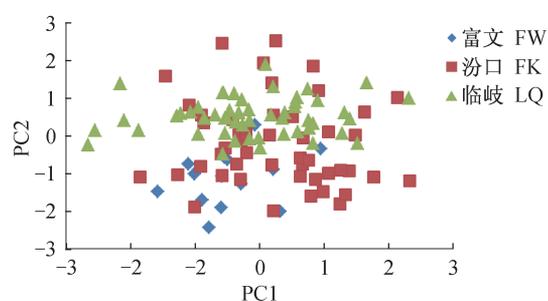


图3 千岛湖大眼华鲮第一、二主成分散点图

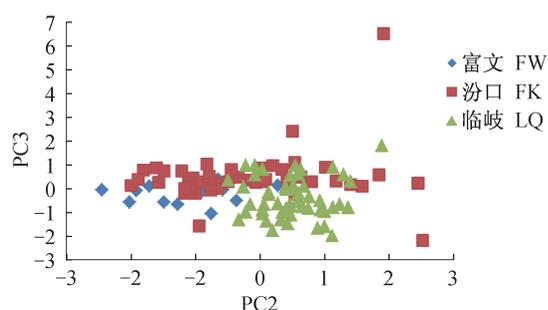
Fig. 3 Scatter plots of scores on PC1 and PC2 of *S. macrops*

图4 千岛湖大眼华鲮第二、三主成分散点图

Fig. 4 Scatter plots of scores on PC2 and PC3 of *S. macrops*

根据相关计算公式及 Kaiser 给出的标准: KMO 值越接近 1, 越适合作因子分析^[9], KMO 度量值为 0.964, Bartlett 的球形度检验被拒绝(表

2), 故所选择变量适合于进行因子分析。

2.2 线粒体 D-loop 序列分析

经比对最终获得 81 条大眼华鲮 924 bp 线粒体 D-loop 序列, 其中保守位点 897 个, 变异位点 27 个, 简约变异位点 21 个, 单个变异位点 6 个。各点以及平均碱基组成见表 3, 其中 A + T 含量(64.82%) 高于 G + C 含量(35.18%), 呈现明显的反 G 偏移^[21]。

表2 KMO 和 Bartlett 检验

Tab. 2 KMO and Bartlett's Test using SPSS program

KMO 度量		0.964
Kaiser-Meyer-Olkin Measure of sampling adequacy		
Bartlett 球形度检验	卡方值 value of Chi-Square	4 235.260
Bartlett's Test of Sphericity	自由度 degrees of freedom	406
	显著水平 significant level	0.000

表3 各点碱基组成比较

Tab. 3 The nucleotide frequencies in three populations

群体 population	T	C	A	G
汾口 FK	32.549	20.799	32.294	14.359
富文 FW	32.537	20.823	32.316	14.325
临岐 LQ	32.498	20.864	32.278	14.359
平均 average	32.528	20.829	32.295	14.349

图 5 为大眼华鲮 81 个样本的 NJ 树, 图中来自 3 个地理群体的个体在系统发生树中并未聚集到独立的支上。使用 DnaSP 5.10 分析了 3 个群体的单倍型, 获得了 35 个单倍型(图 6), 利用

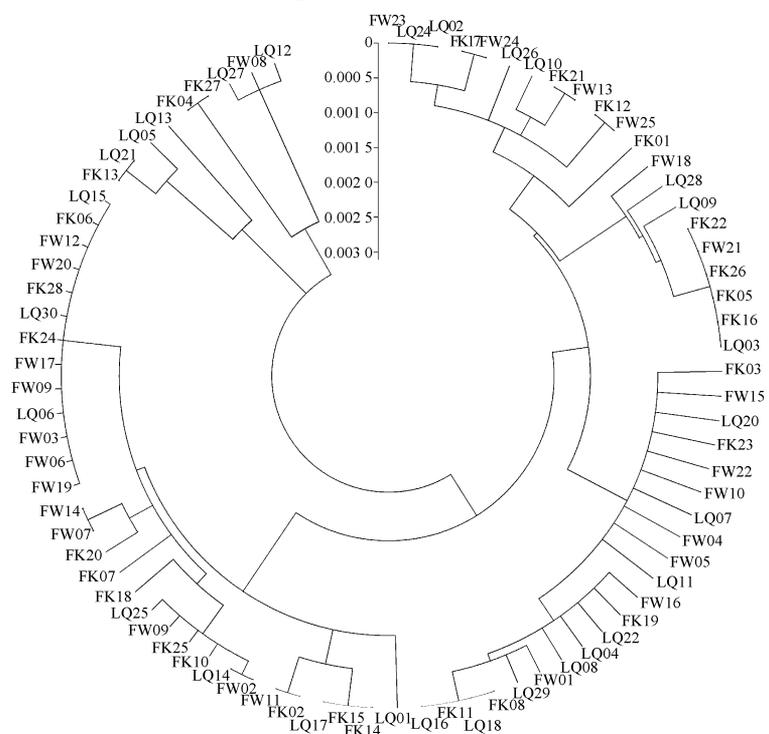


图5 基于线粒体 D-loop 的千岛湖大眼华鲮 81 个样本的 NJ 树

Fig. 5 Phylogenetic tree (NJ) based on D-loop sequences of 81 *S. macrops* samples

```

[      011111222334555555667788889]
[      102469235884023366124736790]
[      681210343678321314015274686]
Hap_1  GCATTCGCGCCGCGTTATAGAAAGAA
Hap_2  .....T..A.....A..
Hap_3  ...C.....A..
Hap_4  ...C...T..AT.....A..G..A..
Hap_5  ...C.....A..
Hap_6  ...C..T..A.....G..A..
Hap_7  A..C..T..A...A.....A..A..
Hap_8  ...CC.....T....GC....A..
Hap_9  ...C..T..A.....A..G
Hap_10 ...C..T..A.....A..A..
Hap_11 .....A..
Hap_12 .....TA....ACC.....A..
Hap_13 .....T..A.....G....A..
Hap_14 A.....G....A..
Hap_15 ...C..T..A.....GA...A..
Hap_16 ...CC.....C....A..
Hap_17 .T.C.T..A...A.....A..
Hap_18 .....T.....A..
Hap_19 ...C..T..A.....A..
Hap_20 ...CC.....T....C....A..
Hap_21 ...C..T..A.....A..TA..
Hap_22 ...C..A.....A..
Hap_23 ...C.....AG.
Hap_24 ...C..T..A...A.....A..
Hap_25 ...C...TA..A.....A..A..
Hap_26 ...C.....A.....
Hap_27 .....G....A..
Hap_28 ...C...A.....A..
Hap_29 .....T.....ACC.....A..
Hap_30 .T.C.....
Hap_31 .....T.....G....A..
Hap_32 ...C...TA.....A..A..
Hap_33 ...C...TA.....C.....A..
Hap_34 ..T.....GA...A..
Hap_35 A..C.....

```

图 6 千岛湖大眼华鲮 D-loop 单倍型变异位点

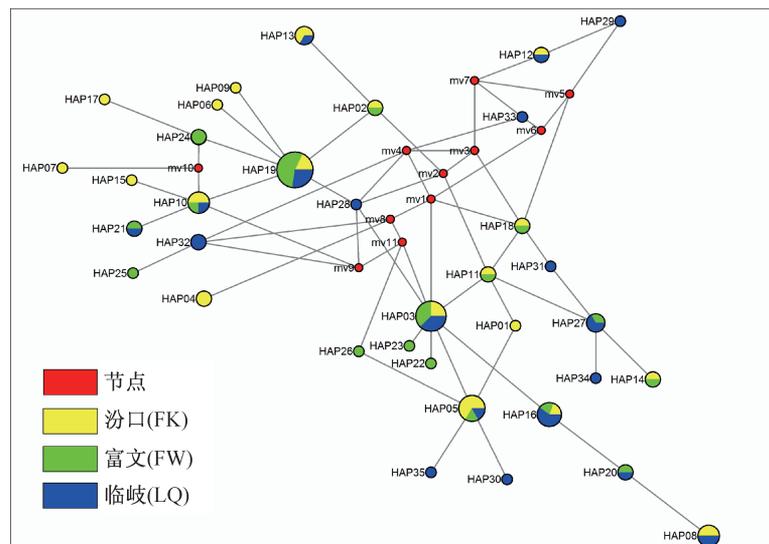
Fig. 6 Mutation sites of D-loop sequences in *S. macrops*

图 7 千岛湖大眼华鲮单倍型网络图

Fig. 7 Network of all D-loop sequences haplotypes in three *S. macrops* populations

Network 4.6.1.0 构建单倍型的网络图,发现单倍型分布并不具有明显的地理格局,而且整个单倍型发育主要分为以 HAP19 和 HAP03 为核心的两个区域,而且这两个区域的联系多是通过节点(图 7)。

利用 DnaSP 5.10 获得了千岛湖 3 个群体的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π),发现来自汾口的群体遗传多样性最为丰富,临岐次之,富文最低。3 个群体都显示出高单倍型多样性和低核苷酸多样性的特点(表 4)。群体间的净遗传距离、遗传分化指数以及基因流见表 5,两两群体间遗传距离很低,且分化不显著。汾口和富文之间的基因流最强。

3 讨论

形态度量学被用于近缘物种的鉴定以及同一物种不同居群的分化差异等研究^[5,8-9,11,15,22-24]。本研究中使用主成分分析对千岛湖 3 个群体的形态参数进行分析,结果显示 3 个群体并不存在显著的形态差异。这与闵锐等^[9]对滇池金线鲃的研究结果相似。根据形态学的结果看,各地理群体之间并未发生分化,可能仍是有效交流群体。

D-loop 区是线粒体中的非编码序列,有时在一些物种中会有一些比例的缺失和插入突变存在^[25]。而 3 个群体 81 个个体的 D-loop 序列分析显示,所有个体都未发生插入或者缺失突变,各群体碱基组成平均差异不大,表明这些个体间在进化上的距离很近。碱基组成符合反 G 偏移,这与其他脊椎动物线粒体所呈现的特点一致^[26]。

表 4 千岛湖 3 个群体遗传多样性比较
 Tab. 4 Haplotype (h), nucleotide diversity (π) for the populations of *S. macrops*

群体 population	个体数 number of individuals	单倍型数 number of haplotypes	变异位点 polymorphic sites	单倍型多样性 haplotype diversity (h)	核苷酸多样性 nucleotide diversity (π)
汾口 FK	28	19	22	0.968 ± 0.018	0.004 76 ± 0.000 49
临岐 LQ	28	19	18	0.968 ± 0.017	0.004 53 ± 0.000 41
富文 FW	25	17	16	0.937 ± 0.037	0.003 30 ± 0.000 35

表 5 千岛湖 3 个群体间的净遗传距离, 遗传分化指数和基因流 (ns: 不显著)
 Tab. 5 Net genetic distance (D_a), pairwise fixation indices (F_{st}) and pairwise gene flow (N_m)
 between populations of *S. macrops* (ns = not significant, $P > 0.05$)

种群 1 population1	种群 2 population2	净遗传距离 net genetic distance (D_a)	遗传分化指数 pairwise fixation indices (F_{st})	基因流 pairwise gene flow (N_m)
汾口 FK	富文 FW	-0.000 08	0.006 30 ns	27.40
汾口 FK	临岐 LQ	-0.000 03	-0.008 08 ns	16.72
富文 FW	临岐 LQ	0.000 04	-0.002 77 ns	10.30

通过建立 NJ 树, 发现各地理群体的个体并未构成单一的支系, 没有定向分化的迹象, 而是混杂地分布在整个 NJ 树中的各分支上。单倍型网络图也呈现出相同的特点, 各群体并未出现个体数大于 2 的特有单倍型。值得注意的是, 虽然没有显示出与地理分布相吻合的特征, 但是在整个千岛湖 35 个单倍型的网络图中, 却主要分成了以 HAP03 和 HAP19 为核心的两个部分, 而连接这两个区域的, 却是一些节点, 这些节点表示可能出现过而没有检测到或已经丧失的单倍型。这可能是由于该种群曾经经历过打击而丧失了一部分低频率等位基因的结果。

对 3 个点多样性的比较显示, 汾口的多样性最高, 临岐次之, 富文最低。由于汾口是来自两个年份的样品, 该点在两年间大眼华鳊种群必定存在一定幅度的动态变化, 因而可能导致该点的多样性较其他点偏高。3 个群体总体来说多样性呈现相似的高 h 和低 π 值的特点, 这与许桂菁等^[12]对钱塘江、闽江等的研究结果相一致, 这个特点也提示我们千岛湖的大眼华鳊可能经历过近期的种群扩张。

基因流是指一些个体从一个群体迁移到另一个群体时会把某基因带到新的群体, 从而产生基因流动, 基因流是影响群体内部和群体之间遗传变异的重要因素^[27]。若 N_m 值大于 1, 表明种群基因漂变不足以造成基因分化^[27]; 若 N_m 大于 4, 表明种群之间是一随机交配的群体^[28]; 若该值很

小 ($N_m < 1$), 则有可能预示着隔离的产生^[29]。基于线粒体 D-loop 序列的大眼华鳊 3 个群体两两间的基因流分析显示, N_m 值都大于 4, 则表明 3 个群体间存在着广泛的基因交流, 构成了一个随机交配群体。其中, 汾口与富文之间的交流最强, 富文与临岐之间的交流最弱, 结合多样性的分析结果, 推测富文的大眼华鳊可能由于生存压力向环境优越的汾口方向移动的程度最大。Wright^[30]认为遗传分化系数 (F_{st}) 常用于评价群体遗传分化程度, 在 0 ~ 1 的范围内, F_{st} 值越大, 两种群间的分化程度越高, 一般评判标准是 $F_{st} < 0.05$ 代表轻度分化, $0.05 < F_{st} < 0.15$ 代表中等分化, $0.15 < F_{st} < 0.25$ 代表高度分化, $0.25 < F_{st} < 1.00$ 代表极高度分化^[31]。3 处的 F_{st} 均远小于 0.05 且分化都不显著 ($P > 0.05$), 另外 3 个地理群体的净遗传距离也很低, 因此我们认为, 3 个地理群体是一个随机交配群体, 未发生遗传学分化。

形态学和分子生物学的结果支持本实验 3 个群体是随机交配群体且没有发生遗传分化, 基因的交流阻止了小种群的形成。小种群由于遗传多样性丧失引起的潜在遗传风险、统计波动以及环境变化或自然灾害, 相比大种群更加容易灭绝^[32]。因此, 由于千岛湖的各地理群体处于一种交流的状态, 因而能够很好地抵御环境带来的风险, 并且保持着丰富的遗传多样性。为了保护这一重要的渔业资源, 建议继续保持千岛湖大眼华鳊的基因流格局, 减少污染物排放、水库中人工设

施的建立以及杜绝水库中网具的滥用。

浙江省杭州千岛湖发展有限公司以及陈来生、王金鹏为本研究的采样工作等提供了帮助,在此致以诚挚的谢意。

参考文献:

- [1] 袁思平,吴仲宁,蔡惠凤,等. 樟溪河渔业资源调查及细鳞斜颌鲷人工繁育[J]. 宁波大学学报:理工版,2010,23(4):31-34.
- [2] 何光喜,张峻德,刘其根,等. 基于单层刺网渔获物的千岛湖鱼类群落结构初步研究[J]. 水产科技情报,2011,38(4):197-203.
- [3] 刘国栋,何光喜,刘其根,等. 千岛湖大眼华鳊年龄、生长和繁殖的初步研究[J]. 上海海洋大学学报,2011,20(3):382-391.
- [4] 陈宜瑜. 中国动物志:硬骨鱼纲,鲤形目[M]. 北京:科学出版社,2000:661.
- [5] 张鸲,谢仲桂,谢从新. 大眼华鳊和伍氏华鳊的形态差异及其物种有效性[J]. 水生生物学报,2004,5(28):511-518.
- [6] Ryman N, Allendorf F W, Stahl G. Reproductive isolation with little genetic divergence in sympatric populations of brown trout (*Salmo trutta*) [J]. Genetics, 1979,92(1):247-262.
- [7] Ferguson A, Mason F M. Allozyme evidence for reproductively isolated sympatric populations of brown trout, *Salmo trutta*, in Lough Melvin, Ireland [J]. Journal of Fish Biology, 1981, 18(6):629-642.
- [8] 孟玮,郭焱,海萨,等. 额尔齐斯河银鲫形态学及 COI 基因序列分析[J]. 淡水渔业,2010,40(5):22-26,31.
- [9] 闵锐,叶莲,陈小勇,等. 滇池金线鲃形态度量学分析[J]. 动物学研究,2009,30(6):707-712.
- [10] 陆清尔. 长潭水库大眼华鳊(*Sinibrama macrops*) 年龄与生长的初步研究[J]. 浙江水产学院学报,1992,2(11):116-122.
- [11] 谢仲桂,谢从新,张鸲. 我国华鳊属鱼类形态差异及其物种有效性的研究[J]. 动物学研究,2003,24(5):321-330.
- [12] 许桂菁,蔡昆展,邵广昭,等. 大眼华鳊亲缘地理与族群遗传结构之研究[J]. 生物学报,2005,40(2):58-67.
- [13] Sambrook J, Fritach E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [14] Liu H, Chen Y. Phylogeny of the East Asian cyprinids inferred from sequences of mitochondrial DNA control region [J]. Canadian Journal of Zoology, 2003, 81(12):1938-1946.
- [15] 李旭,李凤莲,刘恺,等. 中国伊洛瓦底江和怒江褶鳃属鱼类的形态差异及分类地位[J]. 动物学研究,2008,29(19):83-88.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Mega 4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007,24(8):1596-1599.
- [17] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009,25(11):1451-1452.
- [18] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [19] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations [J]. Genetics, 1983, 105(2):437-460.
- [20] Nei M. Evolution of human races at the gene level [M]. New York: Alan R. Liss, 1982:167-181.
- [21] Cantatore P, Roberti M, Pesole G, et al. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals [J]. Journal of Molecular Evolution, 1994,39(6):589-597.
- [22] 郭宪光,张耀光,何舜平. 中国石爬鳃属鱼类的形态变异及物种有效性研究[J]. 水生生物学报,2004,28(3):260-268.
- [23] 海萨,李家乐,冯建彬,等. 基于多变量形态度量学和线粒体 Cyt b 序列的鲈属鱼类分类探讨[J]. 动物学研究,2008,29(2):113-120.
- [24] 王伟,陈立侨,顾志敏,等. 7 个不同翘嘴红鲌群体的形态差异分析[J]. 淡水渔业,2007,37(3):40-44.
- [25] 庆宁,丘城锋,廖伟群,等. 华南沿海西部美丽小条鳅基于线粒体控制区的种群遗传变异及亲缘地理格局[J]. 生态学报,2010,30(1):258-264.
- [26] Hoehne M. Biochemistry and molecular biology of fishes [M]. London: Elsevier Science Publishers, 1993:1-38.
- [27] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236(5):787-792.
- [28] Hartl D L, Clark A G. Principle of population genetics [M]. 2nd edn. Sunderland: Sinauer, 1989.
- [29] Neigel J E. Is F_{st} obsolete? [J]. Conservation Genetics, 2002,3:167-173.

- [30] Wright S. The genetical structure of populations[J]. Ann Eugen, 1951, 15: 323 - 354.
- [31] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(1): 155 - 165.
- [32] 王如平, 李霖. 小种群的灭绝旋涡[J]. 生物学杂志, 2008, 25(6): 14 - 16, 8.

Morphology and D-loop sequence analysis of *Sinibrama macrops* from Qiandaohu Lake

ZHAO Liangjie¹, HE Guangxi², ZHOU Xiaoyu¹, JIA Peiqiao¹,
WU Zhen¹, SONG Gu¹, ZHANG Hong¹, LIU Qigen^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Hangzhou Qiandaohu Exploitation Co. Ltd., Chun'an 311700, China)

Abstract: Morphological and genetic differences of three *Sinibrama macrops* populations from Qiandaohu Lake were compared by traditional morphological method and mitochondrial D-loop region sequence analysis. Based on the results of principal component analysis, specimens clustered together by scatter plots of scores could not be divided. It indicated that there is no morphological differentiation among all samples from Qiandaohu Lake. 27 polymorphic sites were detected yielding 72 haplotypes. NJ tree and network showed that the geographic distribution was ambiguous. There were similar base composition among the three populations, and the content of A + T (64.82%) was higher than the content of G + C (35.18%). High genetic variation (h) and low nucleotide diversity (π) were found in the three populations analyzed for D-loop, and the diversity of Fenkou ($h = 0.968 \pm 0.018$, $\pi = 0.00476 \pm 0.00049$) was the highest, Linqi ($h = 0.968 \pm 0.017$, $\pi = 0.00453 \pm 0.00041$) was the second, Fuwen ($h = 0.937 \pm 0.037$, $\pi = 0.00330 \pm 0.00035$) was the lowest. The values of genetic differentiation index (F_{st}) were lower than 0.05 and not significant ($P > 0.05$). A strong gene flow among the populations was observed ($N_m > 4$), and the N_m between Fenkou and Fuwen was highest ($N_m = 27.40$). The results showed that the three geographical populations belong to a randomly mating population. Consequently, we suggest keeping the pattern of gene flow of *S. macrops*, and reducing the influence of human activities so as to protect this important species in fishery resources.

Key words: *Sinibrama macrops*; morphology; principal component analysis; D-loops; Qiandaohu Lake

Corresponding author: LIU Qigen. E-mail: qgliu@shou.edu.cn