

洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*) *Cytb* 和 *CO I* 基因序列多态性分析*

李大命¹ 李康² 张彤晴¹ 唐晟凯¹ 刘燕山¹
刘小维¹ 穆欢³ 黄越峰³ 潘建林^{1①}

(1. 江苏省淡水水产研究所 江苏省内陆水域渔业资源重点实验室 南京 210017;

2. 南京师范大学生命科学学院 南京 210046; 3. 江苏省洪泽湖渔业管理委员会办公室 淮安 223300)

摘要 为揭示我国洪泽湖大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)遗传多样性现状,科学保护和合理利用大银鱼种质资源,采用线粒体细胞色素 b 基因(*Cytb*)和细胞色素 c 氧化酶 I 亚基基因(*CO I*)序列,分析了洪泽湖 40 尾大银鱼的遗传多样性。通过 PCR 扩增与序列测定分别获得了长度为 1141 bp 和 630 bp 的 *Cytb* 和 *CO I* 基因序列。40 条 *Cytb* 基因序列碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.7%、29.3%、16.7%和 32.3%,检出 6 个变异位点,定义 7 个单倍型,单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.775 和 0.00129,碱基平均差异数为 1.469。40 条 *CO I* 基因序列碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.6%、26.0%、19.2%和 33.2%,检出 5 个变异位点,定义 6 个单倍型,单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.700 和 0.00207,平均碱基差异数是 1.303。*Cytb* 及 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离较小,且 NJ 系统进化树聚为一支,说明大银鱼单倍型没有出现遗传分化。Fu's F_s 中性检验结果和碱基歧点分布图均表明,洪泽湖大银鱼近期经历了种群扩张事件。

关键词 遗传多样性; 细胞色素 b 基因; 细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因; 大银鱼; 洪泽湖
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0025-07

大银鱼(*Protosalanx hyalocranius*)为 1 年生的小型鱼类,隶属于胡瓜鱼目(Osmeriformes)、银鱼科(Salangidae)、大银鱼属(*Protosalanx*),对环境变化反应敏感,是典型的 r-选择物种(王忠锁等,2002)。大银鱼广泛分布于我国钱塘江河口、长江口、长江下游湖泊及黄海、渤海沿岸河口和朝鲜西海岸,为近海河口洄游或淡水定居鱼种。大银鱼肉质鲜美,营养丰富,经济价值较高,曾经是我国重要的出口创汇水产品。近年来,由于环境污染、过度捕捞、水利工程以及生境破碎化等多种因素的影响,大银鱼的种群数量急剧下降,天然资源已逐渐枯竭(王忠锁等,2002)。因此,开展大银鱼资源保护已经迫在眉睫。

鱼类遗传多样性的研究一方面能够掌握渔业种质资源遗传多样性现状,另一方面可以为渔业资源的可持续发展提供重要的科学依据。鱼类线粒体 DNA(mtDNA)是遗传物质的主要载体,具有进化速率快、严格的母系遗传和几乎无重组等特点,是揭示群体遗传多样性及遗传结构的理想材料(吕国庆等,1998)。线粒体细胞色素 b (Cytochrome b, *Cytb*)和细胞色素 c 氧化酶亚基 I (Cytochrome c oxidase subunit I, *CO I*) 基因序列具有进化速度较快、易扩增等优点,适用于种群水平遗传多样性的检测,已被广泛地应用于鱼类等水生生物的系统学和种群遗传学研究中(孙鹏等,2011; 胡静等,2014; 李大命等,2015a)。

* 江苏省水生生物资源重大专项(ZYHB16-3)资助[This work was supported by Major Project of Hydrobios Resources in Jiangsu Province(ZYHB16-3)]. 李大命, E-mail: ldm8212@126.com

① 通讯作者: 潘建林, 研究员, E-mail: Jianlinpan2006@126.com

收稿日期: 2016-08-08, 收修改稿日期: 2016-08-29

洪泽湖面积为 1597 km², 是江苏省第二大湖泊, 也是我国第四大淡水湖泊(朱松泉等, 1993)。洪泽湖渔业资源丰富, 对湖区经济发展具有重要作用(王欣等, 2008)。在 20 世纪六七十年代, 洪泽湖大银鱼资源非常丰富, 每年都形成大规模的银鱼鱼汛, 创造了巨大的经济效益(江苏省地理研究所等, 1977)。近年来, 洪泽湖大银鱼天然资源量急剧下降, 已无法形成有效的捕捞群体。有关洪泽湖大银鱼的研究主要集中在生长、摄食、繁殖及增殖等生物学方面(江苏省地理研究所湖泊室洪泽湖银鱼增殖研究课题组, 1975; 张开翔等, 1981; 林明利等, 2013)。张颖(2005)¹⁾和薛丹(2015)²⁾采用分子生物学技术探究了我国不同地理分布大银鱼群体的遗传多样性及遗传结构, 而有关洪泽湖大银鱼的遗传学特征则尚未见报道。本研究通过对洪泽湖大银鱼的 *Cytb* 和 *CO I* 序列片段进行扩增、测序, 分析其遗传多样性及遗传结构, 不仅有利于丰富我国大银鱼的遗传学资料, 同时可为洪泽湖大银鱼资源的保护及合理利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2015 年 8 月从洪泽湖的韩桥水域(33°24'05"N, 118°41'20"E)采集 40 尾大银鱼样本, 体长在 3.5–7.0 cm 之间(平均值为 5.2 cm), 体重在 0.1562–0.7680 g 之间(平均值为 0.4375 g)。剪取大银鱼尾鳍, 放入无水乙醇中保存, 带回实验室备用。

1.2 基因组 DNA 提取

剪取大银鱼尾鳍组织约 100 mg, 装入 1.5 ml 离心管, 剪碎。采用广谱性基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa, 日本)提取大银鱼基因组 DNA, 将 DNA 溶于 200 μ l TE 溶液中, 置于–20℃保存备用。

1.3 *Cytb* 和 *CO I* 基因扩增、纯化与测序

本研究中, *Cytb* 扩增和测序引物为 L14321 (5'-CCAGTGACTTGAAAAACCACCG-3')、H15634 (5'-CTTAGCTTTGGGAGTTAAGGGT-3')(Zhang *et al.*, 2007)。*CO I* 扩增和测序引物为 F1(5'-TCAACC-AACCACAAAGACATTGGCAC-3')、R1 (5'-TAGACT-

TCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3')(Ward *et al.*, 2005)。PCR 反应总体积均为 50 μ l, 其中 10 \times PCR Buffer (含 Mg²⁺) 5 μ l, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.4 μ l, dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μ l, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ l, DNA 模板 2 μ l (50 ng/ μ l), ddH₂O 补足体积。PCR 扩增反应程序均为 94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 50 s, 72℃延伸 90 s(*Cytb*)或 50 s(*CO I*), 30 个循环, 72℃最后延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 经 DNA 胶回收试剂盒(TaKaRa, 日本)纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。为保证所测序列的准确性, 所有样品均采用双向测序。

1.4 数据分析

所得序列用 ClustalX 软件进行编辑、校对和排序(Thompson *et al.*, 1997)。用 DnaSP4.10 分析软件(Rozas *et al.*, 2003)计算多态位点数目(Number of polymorphic sites)、单倍型数目(Number of haplotypes)、单倍型多样性(Haplotype diversity)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity)和平均碱基差异数(Average number of nucleotide differences)。用 MEGA 4.0 软件(Tamura *et al.*, 2007)统计碱基组成, 并基于 Kimura 双参数模型计算单倍型之间的遗传距离。以太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)的同源序列(GenBank 登录号为 JX524196.1)作为外群, 采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)分别构建 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型系统进化树, 进化树中节点的自举置信度水平由自引导值(Bootstrap value)估计, 共 1000 次循环。

用 Fu's *F_s* 中性检验和核苷酸不配对分布(Mismatch distribution)检测洪泽湖大银鱼种群的历史动态。

2 结果

2.1 *Cytb* 和 *CO I* 基因序列分析

经 PCR 扩增、测序和校对, 获得洪泽湖大银鱼线粒体 *Cytb* 基因全长序列, 其长度为 1141 bp。40 条 *Cytb* 基因同源序列包含 6 个变异位点, 其中有 4 个简约信息位点, 2 个单一信息位点。碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.7%、29.3%、16.7% 和 32.3%, 其中 A+T 的含量(51.0%)略高于 G+C 含量

1) Zhang Y. The study on the genetic diversity of *Protosalanx hyalocranius*. Master's Thesis of Tianjin Normal University, 2005, 1–63 [张颖. 大银鱼遗传多样性的研究. 天津师范大学硕士研究生学位论文, 2005, 1–63]

2) Xue D. Genetic diversity of 9 populations of *Protosalanx hyalocranius* in China based on *Cyt b* sequences. Master's Thesis of Jinan University, 2015, 1–53 [薛丹. 基于细胞色素 b 的中国 9 个大银鱼群体遗传多样性研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2015, 1–53]

(49.0%)。40 条 *Cytb* 基因序列定义了 7 个单倍型(Hb1–Hb7), 其中, 单倍型 Hb1 数量最多(16 个), 单倍型 Hb2 和 Hb6 数量最少, 均只有 1 个。

经 PCR 扩增、测序和校对, 获得洪泽湖大银鱼线粒体 *CO I* 基因序列片段, 其长度为 630 bp。40 条 *CO I* 基因同源序列共有 5 处变异位点, 其中, 有 4 个简约信息位点, 1 个单一信息位点。碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.6%、26.0%、19.2% 和 33.2%, 其中, A+T 的含量(47.6%)略低于 G+C 含量(52.4%)。40 条 *CO I* 基因序列定义了 6 个单倍型(Hc1–Hc2), 其中, 单倍型 Hc3 数量最多(17 个), 单

倍型 Hc2 数量最少(1 个)。

2.2 洪泽湖大银鱼遗传多样性参数

采用 DnaSP 软件获得洪泽湖大银鱼的遗传多样性参数(表 1)。从表 1 可以得出, *Cytb* 基因单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.755 ± 0.045 和 0.00129 ± 0.00010 , 碱基平均差异数为 1.469; *CO I* 基因单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.700 ± 0.047 和 0.00207 ± 0.00016 , 碱基平均差异数为 1.303。结果显示, *Cytb* 和 *CO I* 基因的遗传多样性水平均表现出较高的单倍型多样性和低的核苷酸多样性模式。

表 1 洪泽湖大银鱼遗传多样性参数

Tab.1 Genetic diversity parameters of *P. Hyalocranius* population in the Hongze Lake

群体 Population	样本数 Sample number	基因 Gene	多态位点数 Polymorphic sites	单倍型数 Haplotypes number	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	碱基平均差异数 Average number of nucleotide differences
大银鱼 <i>P. hyalocranius</i>	40	<i>Cytb</i>	6	7	0.755 ± 0.045	0.00129 ± 0.00010	1.469
		<i>CO I</i>	5	6	0.700 ± 0.047	0.00207 ± 0.00016	1.303

2.3 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型系统进化树

采用 Mega 软件分别计算 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离。*Cytb* 基因单倍型之间的遗传距离在 0.001–0.004 之间(表 2); *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离在 0.002–0.005 之间(表 3)。由此可以得出, 洪泽湖大银鱼的 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离较小。

以太湖新银鱼作为外类群, 采用 NJ 法构建了洪泽湖大银鱼 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型的系统树(图 1 和图 2)。由图 1 和图 2 可知, *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型聚为一支, 表明单倍型之间的遗传关系较近, 这与 *Cytb* 和 *CO I* 基因单倍型之间的遗传距离(表 2 和表 3)具有一致性。单倍型之间的遗传距离及系统进化树表明, 洪泽湖大银鱼单倍型之间未出现遗传分化。

表 2 大银鱼 *Cytb* 基因单倍型间的遗传距离
(基于 Kimura-2 parameter 法)

Tab.2 Genetic distance of the haplotypes of *Cytb* of *P. hyalocranius* (by Kimura-2 parameter method)

单倍型 Haplotypes	Hb1	Hb2	Hb3	Hb4	Hb5	Hb6	Hb7
Hb1	–						
Hb2	0.001	–					
Hb3	0.001	0.002	–				
Hb4	0.002	0.003	0.001	–			
Hb5	0.002	0.003	0.001	0.002	–		
Hb6	0.003	0.004	0.002	0.003	0.001	–	
Hb7	0.003	0.004	0.002	0.003	0.001	0.002	–

表 3 大银鱼 *CO I* 基因单倍型间的遗传距离
(基于 Kimura-2 parameter 法)

Tab.3 Genetic distance of the haplotypes of *CO I* of *P. hyalocranius* (by Kimura-2 parameter method)

单倍型 Haplotypes	Hc1	Hc2	Hc3	Hc4	Hc5	Hc6
Hc1	–					
Hc2	0.002	–				
Hc3	0.002	0.003	–			
Hc4	0.003	0.005	0.005	–		
Hc5	0.002	0.003	0.003	0.002	–	
Hc6	0.003	0.005	0.005	0.003	0.002	–

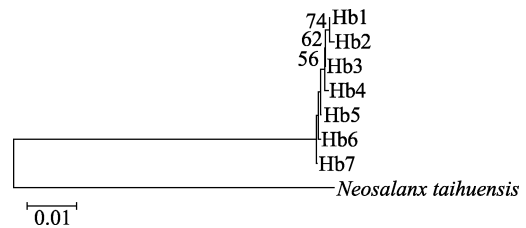


图 1 洪泽湖大银鱼 *Cytb* 基因单倍型的 NJ 系统发生树
Fig.1 Neighbor-joining tree of *Cytb* haplotypes in *P. hyalocranius*

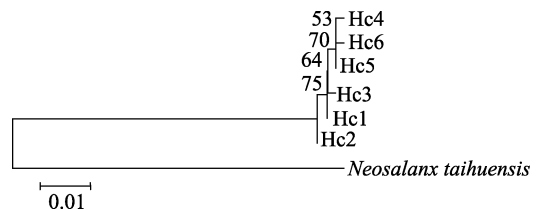


图 2 洪泽湖大银鱼 *CO I* 基因单倍型的 NJ 系统发生树
Fig.2 Neighbor-joining tree of *CO I* haplotypes in *P. hyalocranius*

2.4 大银鱼种群历史动态

中性检验分析结果显示, *Cyrb* 和 *CO I* 基因的 Fu's F_s 值均为负值, 分别为 -0.32836 和 -0.52548 , 但统计检验均不显著($P>0.1$), 显示种群偏离中性进化。碱基歧点分布(Mismatch distribution)分析图谱呈现单峰型(图 3、图 4), 中性检验和碱基歧点分布图均表明, 洪泽湖大银鱼在历史上可能经历了种群扩张事件。

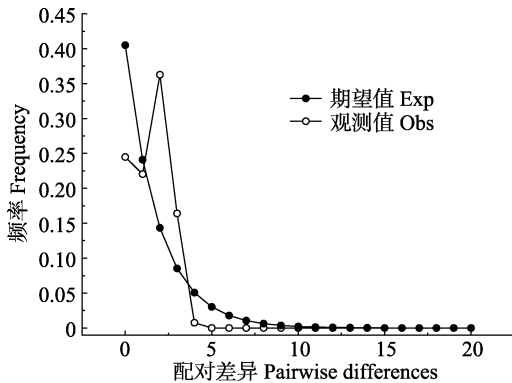


图 3 大银鱼 mtDNA *Cyrb* 基因序列错配碱基分布

Fig.3 The distribution of mismatched bases in mtDNA *Cyrb* gene sequences of *P. hyalocranius*

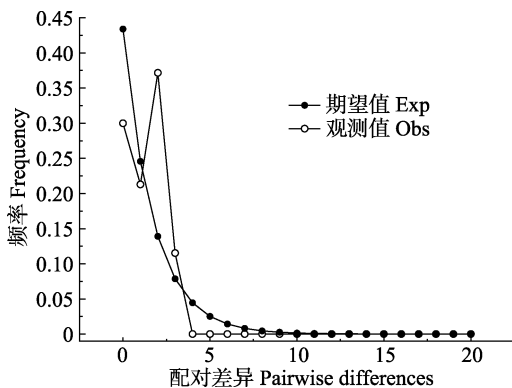


图 4 大银鱼 mtDNA *CO I* 基因序列错配碱基分布

Fig.4 The distribution of mismatched bases in mtDNA *CO I* gene sequences of *P. hyalocranius*

3 讨论

本研究基于线粒体 DNA 的 *Cyrb* 和 *CO I* 基因序列探讨了洪泽湖大银鱼的遗传多样性。通过对 *Cyrb* 和 *CO I* 基因分析得出序列的碱基组成呈现出不均一性, 与鱼类线粒体 DNA 碱基组成具有一致性(孙鹏等, 2011; 胡静等, 2014)。其中, *Cyrb* 基因序列碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 21.7%、29.3%、16.7%和 32.3%, *CO I* 基因序列碱基含量分别是 21.6%、26.0%、19.2%和 33.2%, 2 个基因序列中碱基 G 含量最低, C 含量最高, 表现出明显的偏倚性(张迪等, 2012; 罗旭光等, 2014)。另外, *Cyrb* 基因的 A+T 含量(51.0%)

略大于 G+C 含量(49.0%), 而 *CO I* 基因片段的 A+T 含量(47.6%)略小于 G+C 含量(52.4%), 说明大银鱼线粒体 DNA 不同基因的 A+T 含量与 G+C 含量存在差异。

遗传多样性是指物种内的遗传变异度, 是生物适应环境与进化的基础。单倍型多样性指数、核苷酸多样性指数是衡量一个物种群体多样性的两个非常重要的指标(Vrijenhoek, 1994)。本研究结果显示, 基于 *Cyrb* 和 *CO I* 基因序列的洪泽湖大银鱼单倍型多样性分别为 0.755 ± 0.045 和 0.700 ± 0.047 , 核苷酸多样性分别为 0.00129 ± 0.00010 和 0.00207 ± 0.00016 , 呈现出高单倍型多样性和低核苷酸多样性特征, 与太湖和三峡水库的大银鱼及银鱼科其他种类的多样性特征具有一致性。比如, 太湖大银鱼单倍型和核苷酸多样性分别为 0.850 ± 0.045 和 0.02960 ± 0.00017 (李大命等, 2015b), 三峡水库大银鱼的单倍型和核苷酸多样性分别为 0.804 ± 0.032 和 0.00146 ± 0.00009 (罗宏伟等, 2009)。大银鱼的遗传多样性特征显示, 该类型鱼类群体可能经历过历史扩张事件, 即由一个较小的有效群体在短时间内快速成长为一个大的群体(Grant, 1998)。本研究结果显示, *Cyrb* 和 *CO I* 基因的 Fu's F_s 值为负值, 且碱基歧点分布图谱呈现单峰型, 均表明洪泽湖大银鱼历史上经历了种群扩张。在种群扩张的过程中, 随着种群数量的增加, 单倍型多样性会有所提高, 但没有足够的时间来积累核苷酸产生的变异, 因此, 会造成单倍型多样性较高而核苷酸多样性较低的遗传多样性模式(Grant, 1998)。另外, *Cyrb* 基因单倍型高于 *CO I* 基因单倍型多样性, 说明大银鱼中 *Cyrb* 基因较 *CO I* 基因序列变异速率快, 这与其他鱼类中的规律相似(毕潇潇等, 2009; 孙鹏等, 2011; 胡静等, 2014)。

已有研究结果显示, 洪泽湖的太湖新银鱼单倍型和核苷酸多样性分别为 0.686 ± 0.039 和 0.0021 ± 0.0003 (Zhao *et al.*, 2008), 乔氏新银鱼(*Neosalanx jordani*)单倍型和核苷酸多样性分别为 0.583 ± 0.109 和 0.00067 ± 0.00017 (赵亮等, 2010)。本研究的洪泽湖大银鱼的遗传多样性高于太湖新银鱼和乔氏新银鱼, 但低于太湖及三峡库区的大银鱼遗传多样(罗宏伟等, 2009; 李大命等, 2015b)。从整体来看, 洪泽湖银鱼种质资源遗传多样性处于较低水平。一般来说, 物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。丰富的遗传多样性意味着较高的适应生存潜力、丰富的育种和遗传改良潜力。相反, 物种遗传变异的减少可能导致严重的后果, 如成活率、生长与繁殖效率变低, 降低种群个体对环境变化的适应能力(Yang *et al.*, 2007)。因此, 需要加大洪泽湖银鱼资源保护力度, 逐步恢复银鱼资源量, 提高其遗传多样性,

为洪泽湖银鱼资源可持续发展及利用奠定基础。

从单倍型间的遗传距离和 NJ 系统树可以看出, 洪泽湖大银鱼单倍型之间的遗传距离非常低, 且所有单倍型聚为一支, 表明大银鱼种群内没有出现遗传分化。这表明洪泽湖大银鱼个体间不存在地理隔离, 且有频繁的基因交流, 导致大银鱼具有遗传同质性。同样地, 太湖及三峡库区大银鱼群体的单倍型之间也具有相似规律(罗宏伟等, 2009; 李大命等, 2015b)。本研究表明, 洪泽湖大银鱼单倍型组成有较大差异, 比如, 在 *Cyrb* 基因的 7 个单倍型中, 单倍型 Hb1 数量有 16 个, 而单倍型 Hb2 和 Hb6 数量均只有 1 个; 在 *CO I* 基因的 6 个单倍型中, 单倍型 Hc3 数量有 17 个, 而单倍型 Hc2 数量仅有 1 个。相较而言, 对单倍型数量较少的大银鱼种质资源保护显得尤为重要。目前, 增殖放流是恢复渔业资源量及维持渔业资源可持续发展的重要措施, 但增殖放流群体对野生鱼类资源遗传结构及遗传多样性的影响缺乏科学评价(张燕萍等, 2013; 陈文静等, 2013)。通过分析研究增殖放流群体与野生资源之间的遗传关系, 尽可能补充单倍型数量较少的群体数量, 才能更有利于恢复和提高鱼类种质资源的遗传多样性。因此, 本研究也可以为开展洪泽湖大银鱼增殖放流提供重要参考依据。

参 考 文 献

- Bi XX, Gao TX, Xiao YS, *et al.* Sequence comparison of mtDNA 16S rRNA, CO I and Cyt *b* gene fragments in four species of Gadidae fish. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(3): 46–52 [毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳕鱼线粒体 16S rRNA、CO I 和 Cyt *b* 基因片段序列的比较研究. 南方水产, 2009, 5(3): 46–52]
- Chen WJ, Zhang YP, Duan XB, *et al.* Genetic diversity analysis of *Hypophthal michthys molitrix* between wild and stock enhancement based on mitochondrial control region sequences in the Poyang Lake water system. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(35): 89–95 [陈文静, 张燕萍, 段辛斌, 等. 基于线粒体控制区全序列的鄱阳湖水系鲢增殖放流群体与野生群体的遗传多样性分析. 中国农学通报, 2013, 29(35): 89–95]
- Grant WAS, Bowen BW. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415–426
- Hu J, Hou XY, Yin SW, *et al.* Genetic diversity and divergence of *Cheilinus undulatus* of different geographic populations of the South China Sea revealed by CO I and *Cyrb* gene analyses. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1008–1016 [胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 基于 mtDNA CO I 和 *Cyrb* 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. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1008–1016]
- Jiangsu Institute of Geography, Hongze Lake Icefish Breeding Research Group of Lake Laboratory. Studies on the proliferation of icefish in the Hongze Lake. *Freshwater Fisheries*, 1975(11): 4–6 [江苏省地理研究所湖泊室洪泽湖银鱼增殖研究课题组. 洪泽湖银鱼增殖的研究. 淡水渔业, 1975(11): 4–6]
- Jiangsu Institute of geography, Hongze Lake Fisheries Research Institute, the Hongze Lake Economic Fish Research Group. Prediction and forecasting of fishing conditions of icefish in the Hongze Lake. *Freshwater Fisheries*, 1977(12): 13–16 [江苏省地理研究所, 洪泽县水产研究所洪泽湖经济鱼类增殖研究组. 洪泽湖银鱼渔情的预测和预报. 淡水渔业, 1977(12): 13–16]
- Li DM, Zhang TQ, Tang SK, *et al.* Genetic diversity of wild *Corbicula fluminea* population in the Hongze Lake analyzed by mitochondrial DNA CO I gene sequence. *Progress in Fishery Sciences*, 2015a, 36(5): 81–86 [李大命, 张彤晴, 唐晟凯, 等. 洪泽湖野生河蚬(*Corbicula fluminea*)线粒体 CO I 基因序列的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2015a, 36(5): 81–86]
- Li DM, Zhang TQ, Tang SK, *et al.* Genetic polymorphism of mitochondrial DNA cytochrome b (*cytb*) sequences of *Protosalanx chinensis* in Lake Taihu. *Jiangsu Journal of Agricultural of Sciences*, 2015b, 31(4): 840–845 [李大命, 张彤晴, 唐晟凯, 等. 太湖大银鱼(*Protosalanx chinensis*)细胞色素 b 基因序列多态性分析. 江苏农业学报, 2015b, 31(4): 840–845]
- Lin ML, Zhang TL, Ye SW, *et al.* Status of fish resources, historical variation and fisheries management strategies in Hongze Lake. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(6): 1118–1127 [林明利, 张堂林, 叶少文, 等. 洪泽湖鱼类资源现状、历史变动和渔业管理策略. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1118–1127]
- Lu GQ, Li SF. Advances in the study and application of fish mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5(3): 94–99 [吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展. 中国水产科学, 1998, 5(3): 94–99]
- Luo HW, Duan XB, Wang K, *et al.* Genetic polymorphism analysis of mitochondrial DNA cytochrome b sequences of three species of salangids in the Three Gorges Reservoir. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(6): 16–21 [罗宏伟, 段辛斌, 王珂, 等. 三峡库区 3 种银鱼线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列多态性分析. 淡水渔业, 2009, 39(6): 16–21]
- Luo XG, Qi JW, Zhang LQ, *et al.* Analysis of CO I gene sequences of *Leuciscus waleckii* population in two lakes in Inner Mongolia. *Journal of Inner Mongolia Agricultural*

- University, 2014, 35(2): 1–4 [罗旭光, 齐景伟, 张立群, 等. 内蒙古两个湖泊东北雅罗鱼群 CO I 基因序列分析. 内蒙古农业大学学报, 2014, 35(2): 1–4]
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio CJ, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496–2497
- Sun P, Peng SM, Yin F, *et al.* Population genetic structure of three *Pampus* species from East China Sea inferred by CO I and Cytb sequences. *Marine Fisheries*, 2011, 33(4): 398–404 [孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 利用 CO I 和 Cytb 序列探讨东海区 3 种鲷属鱼类的种群遗传结构. 海洋渔业, 2011, 33(4): 398–404]
- Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596–1599
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882
- Vrijenhoek RC. Genetic diversity and fitness in small populations. *Conservation Genetics*, 1994, 68: 37–53
- Wang X, Zhang SY. Basic way for fishery development and protection of ecological environment at Hongze Lake. *Modern Fisheries Information*, 2008, 23(3): 19–21, 23 [王欣, 张胜宇. 洪泽湖渔业发展与生态环境保护的基本途径. 现代渔业信息, 2008, 23(3): 19–21, 23]
- Wang ZS, Fu CZ, Lei GC. Biodiversity of Chinese icefishes (Salangidae) and their conserving strategies. *Biodiversity Science*, 2002, 10(4): 416–424 [王忠锁, 傅萃长, 雷光春. 中国银鱼的多样性及其保护对策. 生物多样性, 2002, 10(4): 416–424]
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2005, 360(1462): 1847–1857
- Yang P, Zhang H, Chen LQ, *et al.* Genetic structure of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* from the Yangtze and Lancang Rivers inferred from CO I gene sequence. *Zoological Research*, 2007, 28(2): 113–118
- Zhang D, Lei GC, Gong C, *et al.* Genetic diversity of *Neosalanx taihuensis* based on mitochondrial CO I sequences. *Journal of Lake Sciences*, 2012, 24(2): 299–306 [张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 CO I 基因序列的太湖新银鱼遗传多样性. 湖泊科学, 2012, 24(2): 299–306]
- Zhang J, Li M, Xu MQ, *et al.* Molecular phylogeny of icefish Salangidae based on complete mtDNA cytochrome *b* sequences, with comments on estuarine fish evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2007, 91(2): 325–340
- Zhang KX, Zhuang DD, Zhang L, *et al.* On the *Protosalanx hyalocranius* and its propagation in Hongze Hu. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(1): 29–39 [张开翔, 庄大栋, 张立, 等. 洪泽湖所产大银鱼生物学及其增殖的研究. 水产学报, 1981, 5(1): 29–39]
- Zhang YP, Chen WJ, Wang DQ, *et al.* Genetic analysis of wild and proliferation groups of grass carp from Poyang Lake system by multiplex PCR. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(9): 207–211 [张燕萍, 陈文静, 汪登强, 等. 鄱阳湖水系草鱼野生及增殖放流群体遗传多样性分析. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 207–211]
- Zhao L, Zhang J, Liu ZJ, *et al.* Complex population genetic and demographic history of the *Salangid*, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome *b* sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8(5): 201
- Zhao L, Zhang J, Liu ZJ, *et al.* Population genetic structure and demographic history of *Neosalanx jordani* based on cytochrome *b* sequences. *Biodiversity Science*, 2010, 18(3): 251–261 [赵亮, 张洁, 刘志瑾, 等. 乔氏新银鱼基于细胞色素 *b* 序列的种群遗传结构和种群历史. 生物多样性, 2010, 18(3): 251–261]
- Zhu SQ, Dou HS. *Lake Hongze-water and aquatic resources*. Heifei: Press of University of Science and Technology of China, 1993, 174–181 [朱松泉, 窦鸿身. 洪泽湖-水资源和水生生物资源. 合肥: 中国科技大学出版社, 1993, 174–181]

(编辑 马瑾艳)

Genetic Polymorphism Analysis of *Cytb* and *CO I* Gene Sequences of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake

LI Daming¹, LI Kang², ZHANG Tongqing¹, TANG Shengkai¹, LIU Yanshan¹,
LIU Xiaowei¹, MU Huan³, HUANG Yuefeng³, PAN Jianlin¹①

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Key Laboratory of Fisheries Resources in Inland Water of Jiangsu Province, Nanjing 210017; 2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046; 3. Hongze Lake Fisheries Administration Committee Office of Jiangsu Province, Huai'an 223300)

Abstract In order to analyze the genetic diversity of *Protosalanx hyalocranius* in the Hongze Lake, the mitochondrial cytochrome b (*Cytb*) and cytochrome c oxidase subunit I (*CO I*) gene sequences were investigated in this study. Using PCR amplification and sequencing, 1141 bp of *Cytb* and 630 bp of *CO I* sequences were identified. For the *Cytb* sequence, the contents of A, T, G and C accounted for 21.7%, 29.3%, 16.7%, and 32.3% respectively. Six polymorphic sites and 7 haplotypes were obtained from 40 individuals. The haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.775 and 0.00129 respectively. The average nucleotide difference was 1.469. For the *CO I* sequence, the contents of A, T, G and C accounted for 21.6%, 26.0%, 19.2% and 33.2% respectively. Five polymorphic sites and 6 haplotypes were obtained from 40 individuals. The haplotype diversity and nucleotide diversity were 0.700 and 0.00207 respectively. The average nucleotide difference was 1.303. The kimura-two-parameters analysis showed that the genetic distances of the haplotypes varied between 0.001 and 0.004 for *Cytb*, and between 0.002 and 0.005 for *CO I*. Furthermore, the phylogenetic tree constructed with the neighbor-joining (NJ) method indicated that the haplotypes of *P. hyalocranius* formed one clade, which suggested that there was no genetic differentiation in the haplotypes of *Cytb* and *CO I* of *P. hyalocranius*. Fu's F_s values (-0.32836 for *Cytb* and -0.52548 for *CO I*) in the neutrality test was negative, but there was no significant difference. The mismatched bases distribution analysis showed a peak type, which indicated that *P. hyalocranius* in the Hongze Lake had experienced a population expansion.

Key words Genetic diversity; *Cytb*; *CO I*; *Protosalanx hyalocranius*; Hongze Lake

① Corresponding author: PAN Jianlin, E-mail: Jianlinpan 2006@126.com