

草鱼中国土著群体与欧美日移居群体遗传差异的线粒体序列分析

宋 晓 李思发 王成辉 徐嘉伟 杨琴玲

(上海海洋大学,农业部水产种质资源利用重点开放实验室,上海 201306)

摘要:草鱼是中国的土著鱼类,自 20 世纪 60 年代以来已被移居到 100 多个国家和地区,主要用来控制水草或水产养殖。本研究通过线粒体 D-Loop 区(764bp)和 COII + tRNA 基因(719bp)序列分析,了解草鱼的中国土著群体(长江、珠江、黑龙江)和国外移居群体(匈牙利多瑙河、美国密西西比河、日本利根川河)之间以及各地方群体间的遗传差异。结果表明,中国土著草鱼群体的遗传变异高于国外移居群体;分子方差分析(AMOVA)表明,不同草鱼群体的遗传变异主要来自群体内,而不同地域间的差异极少;群体两两间 *F_{st}* 值比较表明,大多数群体之间遗传差异极显著;由 TCS 构建的单倍型网络结构图显示,长江草鱼群体是最原始的群体,其他水系草鱼均由长江群体演化而来;通过基因流分析发现,匈牙利多瑙河群体和日本利根川河群体来自长江和黑龙江群体,美国密西西比河群体除引自长江、黑龙江水系外,还有部分引自于珠江水系。

关键词:草鱼;土著群体;移居群体;线粒体序列;遗传差异

中图分类号:Q346 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)04-0709-08

草鱼是中国的土著鱼类,自然分布于长江、黑龙江及珠江等大型水系的流域中,是一种重要的经济鱼类。草鱼起源于中国平原复合体,但由于长期地理环境隔绝、适应和变异积累等原因,草鱼在我国已经形成了不同的地理群体。黑龙江水系的草鱼,就是在新世以前,当嫩江与辽河、渤海相通的时候,由江河平原区进入黑龙江水系;而珠江水系的草鱼则可能是当冰川期海平面较现在低 100 多米时,由长江、钱塘江下游扩展过去的^[1]。

自 20 世纪 60 年代以来,草鱼在世界范围内被广泛引种,主要用于控制水草和养殖。到 1988 年,已有 49 个国家引进草鱼,最初从中国引种,随后有的国家和地区又从引进国家间接引种^[2]。到 2004 年,全世界已经有 100 多个国家引进草鱼,并且在欧洲、北美及东亚(如日本等)的一些江河里建群定居^[3,4]。

在中国,不同草鱼群体之间遗传变异以及相互关系已经有较多研究,研究方法涉及同工酶分析^[5,6]、mtDNA-RFLP 分析^[7,8]、RAPD 分析^[9]、直接测序分析^[10,11]、微卫星分析^[12,13]等。研究对象主要围绕长江草鱼群体进行,对国内其他水系草鱼群体的比较研

究则很少,主要有 20 世纪 80 年代李思发等^[14]对长江、珠江、黑龙江三大水系草鱼的形态和同工酶分析,薛国雄等^[15]对长江、珠江和黑龙江草鱼群体的 RAPD 分析。在国外,对草鱼的研究主要集中于控制水草的生态功能方面^[16,17]以及多倍体育种方面,如在美国,为了防止草鱼过量繁殖和对本土鱼类造成危害,研制了不育的三倍体草鱼^[18-20]。但目前,对于草鱼我国土著群体与国外移居群体的比较研究尚未见报道。

鉴于半个世纪以来草鱼在国内外的广泛养殖和定居,我们颇想知道,目前国内长江、黑龙江及珠江草鱼群体间的遗传关系如何?草鱼国内土著群体与国外移居群体之间的遗传关系如何?国外群体究竟来源于国内哪个水系?本文试图利用分子生物学手段来探讨国外草鱼移居群体的来源,最终为保护和开发利用这一重要种质资源提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集 本实验所用草鱼样本,除采自日本埼玉县利根川河畔的铃木水产养殖场为人工繁育群体外,全部采自野生群体或原种场保养的野生群体。

收稿日期:2008-10-28;修订日期:2009-01-09

基金项目:国家自然科学基金重点项目:鲢鳙草鱼团头鲂遗传资源变迁(No. 30630051)资助

作者简介:宋晓(1983—),男,汉族,山东乳山人;硕士研究生;研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: songxiaol98327@163.com

通讯作者:李思发,博士生导师;E-mail: sfli@shou.edu.cn

在国内,长江群体分别采自湖北石首老河长江家鱼原种场和江苏邗江长江系家鱼原种场,黑龙江群体采自黑龙江抚远江段,珠江群体采自广东肇庆江段。在国外,采集了美国密西西比河及其支流伊利诺尼

斯河的 2 个野生群体,匈牙利多瑙河 2 个养殖场收集的 3 个野生群体。采集情况具体如表 1 和图 1 所示。所有样本剪取尾鳍,置 95% 酒精中保存。本试验共分析草鱼样本 186 尾。

表 1 草鱼样本采集信息
Tab. 1 Sampling data of the grass carp

国家,种群 Country, Population	采集地点和时间 Sampling Location and data	状态 Status	尾数 No.	个体规格 Specification	代号 Symbol
中国 China					
长江,邗江群体 Hanjiang population, Yangtze	江苏省邗江四大家鱼原种场 Hanjiang stock seed farm of Chinese carp, Jiangsu Province, 2005	原种场保养 Breed in stock seed farm	29	成鱼 Adult	YZ-1
长江,石首群体 Shishou population, Yangtze	湖北省老江河四大家鱼原种场 Laojianghe stock seed farm of Chinese carp, Hubei Province, 2007	原种场保养 Breed in stock seed farm	28	成鱼 Adult	YZ-2
珠江群体 Pearl population	珠江肇庆江段 Zhaoqing section of Pearl River, 2007	野生 Wild	30	成鱼 Adult	ZJ
黑龙江群体 Amur population	黑龙江抚远江段 Fuyuan section of Amur River, 2007	野生 Wild	27	成鱼 Adult	HLJ
匈牙利 Hungary					
多瑙河群体 Danube population	匈牙利 Szegedfish 养殖场 Szegedfish Farm, Hungary, 2005	养殖场保养 Breed in farm	10	鱼种 Fingerling	DU-1
多瑙河群体 Danube population	匈牙利 Hortobagy 养殖场; Hortobagy Farm, Hungary, 2007	养殖场保养 Breed in farm	9	亲鱼 Broodstock	DU-2
多瑙河群体 Danube population	匈牙利 Szegedfish 养殖场; Szegedfish Farm, Hungary, 2007	养殖场保养 Breed in farm	6	亲鱼 Broodstock	DU-3
美国 USA					
密西西比河群体 Mississippi population	美国密西西比河; 2007, Mississippi River, USA	野生 Wild	18	亲鱼 Broodstock	MSB
伊利诺尼斯河群体 Illionsis Population	美国伊利诺尼斯河; 2007, Illionsis River, USA	野生 Wild	10	亲鱼 Broodstock	IR
日本 Japan					
利根川河群体 Tongawa population	日本埼玉县铃木水产养殖场 Suzuki aquaculture farm in Saitama county, Japan, 2007	养殖 Farmed	30	鱼种 Fingerling	TONG

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、测序 剪取小部分鳍条,烘干。加入 400 μ L STE 缓冲液(30mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 200mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl)。混匀后加入浓度为 10% 的 SDS 90 μ L 和 20mg/mL 的蛋白酶 K 10 μ L, 55 $^{\circ}$ C 消化 12—14h; 加入 350 μ L 饱和的 NaCl 溶液,混合均匀,轻摇 3min。然后再加入 400 μ L 的氯仿,轻轻混合均匀。室温 12000r/min 离心 20min,将上清液转移到一个干净的离心管中,加入 450 μ L 预冷(-20 $^{\circ}$ C)的异丙醇,4 $^{\circ}$ C, 13000r/min 离心 20min,将上清液倒掉,加入 800 μ L 预冷(-20 $^{\circ}$ C)的 75% 的乙醇,混匀,4 $^{\circ}$ C, 13000r/min 离

心 15min,倒掉乙醇,烘干。加入 100 μ L 的 TE 液溶解备用。

根据已报道的草鱼线粒体 DNA 全序列^[21](GenBank 序列号 NC_010288),设计引物。其中扩增 Dloop 区的引物为:DL-F:5'-GCT CCC AAA GCC AGA ATT-3'和 DL-R: 5'-ATG CGG AGT TTC TTA GGA CC-3'。扩增 COII + tRNA 基因(以下称 COII 基因)的引物为:COII-F: 5'-CAA GCC AGT CAC ATA ACC ACT-3'和 COII-R :5'-AGG ATT GCA AAT CAG GGG-3'。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,接下来进行 40 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性

30s, 53℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 40 个循环后, 72℃ 延伸 10min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测, 120V 电压下电泳 60min 之后, 经凝胶成像分析系统确定 PCR 扩增产物的大小。扩增产物经纯化后直接测序, 测序引物与扩增引物相同。纯化、测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 序列重排与数据分析 采用 BioEdit 软件对序列进行编辑^[22], 用 ClustalW 软件^[23]进行序列重排

并进行人工校正, ILD (Incongruence Length Difference)^[24] 检验两个序列是否可以合并分析。用 Arlequin 3.01 软件^[25] 计算群体的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π), 以及分子方差分析 (AMOVA) 和 Tajima's D 值检验^[26]。MEGA 4 软件^[27] 分析序列的碱基组成、转换数/颠换数、变异位点、简约信息位点和单位点。TCS 1.21 软件^[28] 对单倍型作最小拓展网络 (Minimum spanning network) 分析。Migrate-2.4.3 软件^[29] 计算群体间基因流。

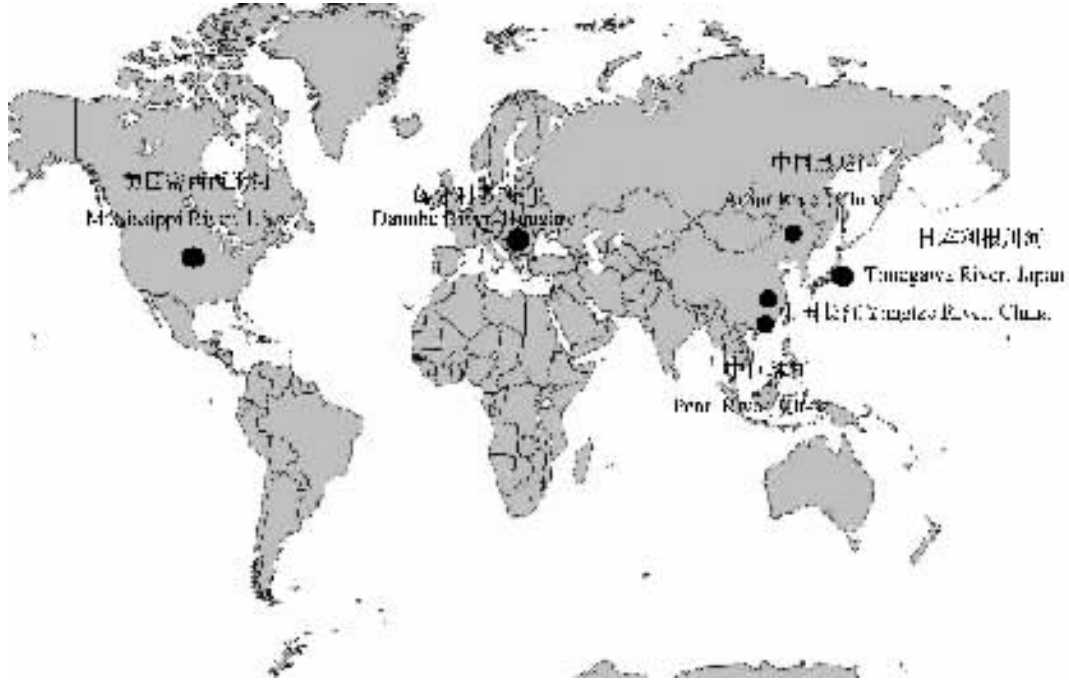


图 1 草鱼样本采集地点

Fig. 1 The rivers where the grass carp samples were collected

2 结果

2.1 序列变异

本实验共测序了 186 尾个体的 D-Loop 区 (764bp) 和 COII (719bp) 序列。在 D-Loop 区共发现了 25 个变异位点, 其中简约信息位点 13 个; 在 COII 序列共发现 11 个变异位点, 其中简约信息位点 6 个 (表 2)。ILD 检验 ($p = 0.42$) 两个序列可合并分析。

在两个合并序列中 (1483bp), 共发现了 32 个单倍型, 其中有 5 个为共享单倍型 (表 3), YZ001 为所有群体都共享的单倍型, YZ002 为长江、珠江、匈牙利多瑙河群体的共享单倍型, YZ005 为长江群体与匈牙利多瑙河群体的共享单倍型, YZ019 为长江与珠江群体的共享单倍型, ZJ481 为珠江与黑龙江群体的共享单倍型。其他单倍型则为各个群体所特

有的单倍型。从单倍型数据看, 各群体之间既有共享单倍型, 又有各自所特有的单倍型。其中共享的多数为长江群体中的单倍型。

表 2 草鱼各群体的变异位点、简约信息位点、单位点、转换/颠换及有效群体大小

Tab. 2 The variable sites, parsim-info sites, singleton sites, transition/transversion values and effective population size in different populations of grass carp

		YZ	ZJ	HLJ	TONG	DU	MSB
D-Loop	V	13	14	21	1	2	12
	Pi	10	11	1	0	2	1
	S	3	3	20	1	0	11
COII	Θ	0.00213	0.00187	0.00964	0.00043	0.00029	0.00108
	R	—	65.0	3.4	0.0	—	2.7

注: V: 变异位点; Pi: 简约信息位点; S: 单位点; R: 转换/颠换; Θ: 有效群体大小

Note: V: variable sites; Pi: parsim-info sites; S: singleton sites; R: transition/transversion values; Θ: effective population size

表 3 草鱼各群体共享单倍型

Tab. 3 The shared haplotypes in different populations of the grass carp

单倍型 Haplotype	中国 China			日本 Japan		匈牙利 Hungary			美国 USA		总计 Total
	YZ-1	YZ-2	ZJ	HLJ	TONG	DU-1	DU-2	DU-3	MSB	IR	
YZ001	12	7	5	18	29	5	5	4	17	4	106
YZ002	9	2	2			1					14
YZ005	2					2	4	2			10
YZ019	2	4	2								8
ZJ481			1	1							2

2.2 种群结构和变异

各群体的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 列于表 4。全部群体的单倍型多样性分布于 0.0667—0.8860 之间, 核苷酸多样性分布于 0.0001—0.0042 之间。两者的总体趋势都是国内土著群体的多态性高于国外移居群体, 而在国外居群体中, 日本利根川河群体最低 ($h = 0.0667$, $\pi =$

表 4 草鱼各群体的单倍型多态性、核苷酸多态性以及 Tajima's D 值

Tab. 4 The haplotype (h), nucleotide diversities (π) and Tajima's D in different populations of the grass carp (Mean \pm S. D.)

群体 Population	D-Loop + COII		
	单倍型多态性 Haplotype diversities (h)	核苷酸多态性 Nucleotide diversities (π)	Tajima's D
中国 China	0.7249 (± 0.0601)	0.0019 (± 0.0011)	-0.8134 ($p = 0.2330$)
YZ-2	0.8800 (± 0.0405)	0.0028 (± 0.0016)	-0.0651 ($p = 0.4990$)
	0.8860 (± 0.0316)	0.0042 (± 0.0023)	1.1806 ($p = 0.8930$)
	0.5613 (± 0.0316)	0.0013 (± 0.0023)	-2.5094 ($p = 0.8930$)
日本 Japan	0.0667 (± 0.1138)	0.0001 (± 0.0008)	-1.1470 ($p = 0.0000$)
TONG	0.0667 (± 0.0613)	0.0001 (± 0.0001)	-1.1470 ($p = 0.0520$)
	0.6071 (± 0.1640)	0.0016 (± 0.0011)	0.9315 ($p = 0.8280$)
匈牙利 Hungary	0.6667 (± 0.1048)	0.0019 (± 0.0012)	1.7542 ($p = 0.9850$)
DU-2	0.5333 (± 0.1721)	0.0018 (± 0.0013)	1.0319 ($p = 0.8710$)
	0.1111 (± 0.0964)	0.0007 (± 0.0005)	-2.1473 ($p = 0.0030$)
美国 USA	0.6786 (± 0.1220)	0.0010 (± 0.0008)	-0.9234 ($p = 0.2240$)
IR			

0.0001), 匈牙利多瑙河群体最高 ($h = 0.6667$, $\pi = 0.0019$); 在国内土著群体中, 珠江群体最高 ($h = 0.8860$, $\pi = 0.0042$), 黑龙江群体最低 ($h = 0.5613$, $\pi = 0.0013$)。各群体的 Tajima's D 值显示: 长江、黑龙江、日本利根川河和美国密西西比河群体均为负值, 其他群体为正值。

将全部群体按采样地域归纳为中国、匈牙利、美国和日本四个组别, 然后进行分子方差分析 (AMOVA), 结果列于表 5。发现总变异的 77.27% 来自于群体内, 22.35% 来自群体间, 只有 0.38% 来自国家间。

表 5 不同草鱼群体的 AMOVA 分析

Tab. 5 Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) for different populations of the grass carp

变异来源 Source of variation	占总变异的百分比 Percentage of variation (%)	分化指数 Fixation indices	p 值 p value
国家间 Among countries	0.38	$F_{CT} = 0.0038$	0.4800
群体间 Among populations	22.35	$F_{SC} = 0.2244$	< 0.001
群体内 Within populations	77.27	$F_{ST} = 0.2273$	< 0.001

表 6 为群体间遗传分化指数 (F_{ST})。国内长江、珠江和黑龙江草鱼群体间差异显著 ($p < 0.05$); 长江群体与匈牙利多瑙河群体之间差异不显著 ($p = 0.100 - 0.706$), 黑龙江群体与美国密西西比河群体差异也不显著 ($p = 0.950$); 珠江群体、日本利根川河群体与其他群体差异极显著 ($p < 0.01$)。美国境内和匈牙利境内的不同采样群体间均不存在显著差异。

2.3 系统发生关系

通过 TCS 软件得到单倍型网络结构图表明 (图 2), 长江群体单倍型 YZ001 为原始单倍型, 其他单倍型都是在此单倍型基础上经过一次或数次变异而产生。

表 6 草鱼各群体间 F_{ST} 值Tab. 6 Population pairwise F_{ST} values for different populations of the grass carp

	YZ-1	YZ-2	ZJ	HLJ	TONG	DU-1	DU-2	DU-3	MSB	IR
YZ-1										
YZ-2	0.0936 **									
ZJ	0.2443 **	0.2094 **								
HLJ	0.1476 **	0.0916 **	0.3564 **							
TONG	0.2846 **	0.1836 **	0.4736 **	0.0097 **						
DU-1	-0.0394 ^N	0.0695 ^N	0.2251 *	0.1052 *	0.4561 **					
DU-2	0.0473 ^N	0.1551 *	0.2279 **	0.2504 **	0.5906 **	-0.0757 ^N				
DU-3	-0.0223 ^N	0.0668 ^N	0.2025 *	0.1155 ^N	0.5327 *	-0.1575 ^N	-0.1316 ^N			
MSB	0.1599 **	0.0760 *	0.3385 **	-0.0264 ^N	0.0251 ^N	0.1774 *	0.3338 *	0.2052 ^N		
IR	0.1905 **	0.1028 ^N	0.3288 **	0.0357 ^N	0.3336 **	0.1805 *	0.2976 *	0.1884 *	0.0986 ^N	

** : $p < 0.01$; * : $p < 0.05$; N: no significance ($p > 0.05$)

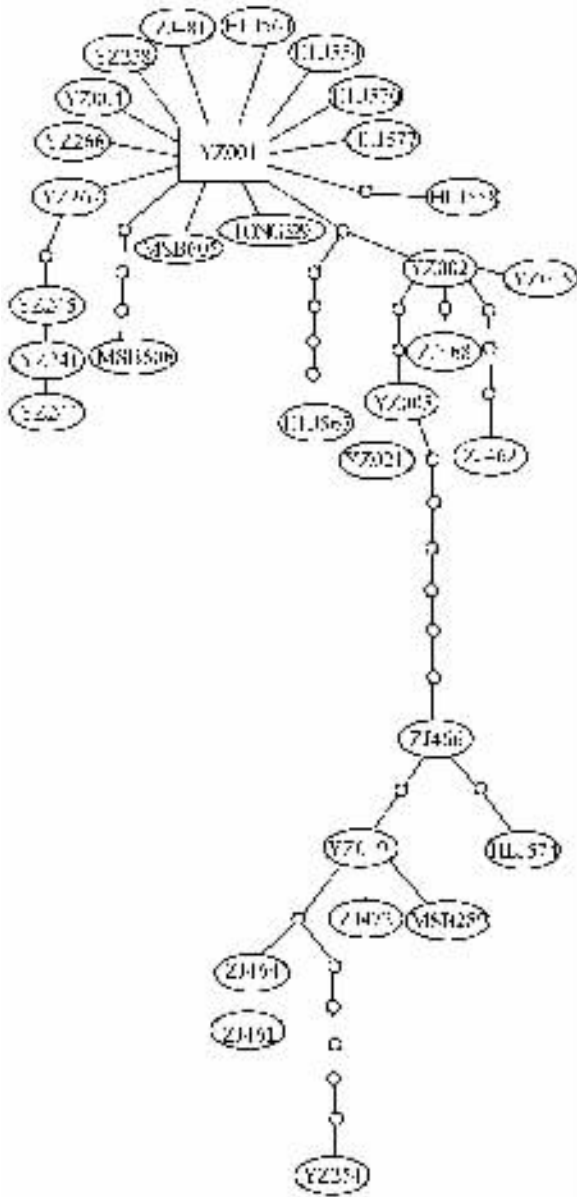


图 2 草鱼各群体单倍型网络结构图

Fig. 2 The haplotypes network for grass carp populations

YZ: 长江; ZJ: 珠江; HLJ: 黑龙江; TONG: 利根川河; MSB: 密西西比河

YZ: Yangtze River; ZJ: Pearl River; HLJ: Amur River; TONG: Tونغawa River; MSB: Mississippi River

用 Migrate-2.4.3 软件计算的各群体间的基因流(图 3), 图中数值表示两群体间基因流大小, 基因流数值越大, 对应的箭头越粗, 表明两群体间基因交流的数量越多。由图可见, 所有的基因流都是以长江群体为起点, 长江群体与各个地方群体均有基因流, 珠江群体与美国密西西比河群体有基因流, 黑龙江群体与日本利根川河、美国密西西比河、匈牙利多瑙河群体均有基因流, 珠江与黑龙江群体之间也有微弱的基因流。

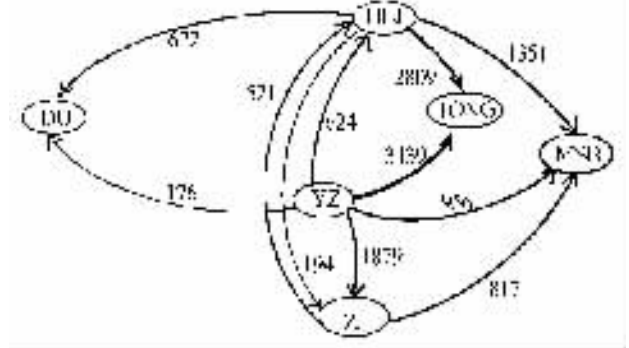


图 3 草鱼各群体间的基因流

Fig. 3 The gene flow among the populations of the grass carp

YZ: 长江; ZJ: 珠江; HLJ: 黑龙江; TONG: 利根川河; DU: 多瑙河; MSB: 密西西比河; 图中数值表示箭头连接的两个群体间基因流大小
YZ: Yangtze River; ZJ: Pearl River; HLJ: Amur River; TONG: Tونغawa River;

DU: Danube River; MSB: Mississippi River; the values in the Fig. 3 show the gene flow between populations

3 讨论

3.1 草鱼种群遗传结构和变异

从单倍型多态性和核苷酸多样性看, 国内群体总体上要高于国外群体, 可能是由于国内群体数量大, 而移植到国外的草鱼的基础群体一般都很小(如首批移植到美国的草鱼仅 70 尾^[4]), 由此而产生的遗传瓶颈或基因漂变等原因, 使移植群体在移

植后的多态性有所降低。在我国国内各江河群体间,多态性的高低是珠江群体 > 长江群体 > 黑龙江群体。

从群体间遗传分化指数(F_{st})可以看出,国内长江、珠江和黑龙江三大水系草鱼群体存在显著的遗传分化。李思发等^[14]用同工酶分析方法,薛国雄等^[15]用 RAPD 方法曾发现三大水系草鱼存在显著差异,并且每一水系的草鱼都有各自特征的条带,可以作为种群鉴定的依据。但本实验并没有找到特异的碱基位点可以将三江水系草鱼群体区分开来,可能是由于研究分析方法以及分析区域的不同造成的。

对于长江草鱼群体,本研究测序了 53 个样本,共 1483bp 长的序列,共发现 13 个变异位点,位点变异率为 0.88%,变异很小。李思发等^[7]用 RFLP 方法研究了长江中下游草鱼 3 个地方群体的线粒体 ND5/6、Cytb 基因和 D-Loop 区,结果表明群体间无显著差异,基因型分布亦无区域性。张四明等^[9]采用 RAPD 方法对长江干流中游的湖北嘉鱼与江西瑞昌两个地方群体和上游的汉江和湘江两大支流的草鱼的群体所得的遗传分化指数 G_{st} 表明,四个地方群体草鱼的遗传分化较低。廖小林等^[12]采用微卫星的方法研究长江水系草鱼遗传多样性认为目前长江草鱼群体分化微弱。本研究结果同前人研究结果可谓是异曲同工,都表明长江水系内草鱼群体间无显著差异。其原因是否是由于长江水系经常性的局部洪水或流域性大洪水以及历史上的河流改道、江湖阻隔等因素所引发的作用抹掉了可能的群体分化。对于这类问题,我们将在随后的研究中进一步探讨。

Tajima's D 值是基于种内多态性的中性检验。环境的负选择、搭载效应、瓶颈效应和大规模的碱基插入或缺失都有可能造成其负值;反之,当种群受到平衡选择的作用时,其值可能为正值^[30]。本研究发现,长江群体、黑龙江群体、日本利根川河群体及美国密西西比河群体的 Tajima's D 值都为负值,我们推测这些草鱼群体可能经历过一定的遗传瓶颈,而后又繁衍扩张,尤其是黑龙江群体为显著的负值,表明黑龙江草鱼曾经历过种群扩张过程。由此,我们支持张四明等^[31]的观点:长江水系中草鱼的数量与其遗传多样性成反比,可能是由于在历史上经历了一次瓶颈效应,由一个相对较小的群体演化而来。可初步认为这是长江水系草鱼群体间无显著差异的重要缘由。

3.2 系统发生关系

从单倍型分布频率来看,在 32 个单倍型中,有

5 个为共享单倍型,其余为各个群体所特有的单倍型。各群体间既有共享单倍型,又有各自所特有的单倍型,其中共享单倍型的多数为长江群体中的单倍型,这表明,长江群体为原始群体。

用 TCS 软件得到的单倍型网络结构图(图 2)显示,单倍型 YZ001 为原始单倍型,其他单倍型都是在此基础上经过一次或数次变异产生。群体间的基因流(图 3)启示我们,美国密西西比河群体可能有 3 个来源:长江、珠江和黑龙江;日本利根川河群体可能来自长江群体和黑龙江群体,匈牙利多瑙河群体可能来自长江群体和黑龙江群体;而所有的基因流都是源自长江群体,经过珠江、黑龙江流向其他群体,这与单倍型网络结构图的结果一致。

致谢:

感谢赵金良教授、钟俊生教授、陈永乐先生、叶海富先生、美国国家地理局哥伦比亚环境研究中心的 Duane Chapman 博士以及匈牙利灌溉、渔业和水产养殖研究所的 Jeney Zsigmond 博士等帮助采集样本。

参考文献:

- [1] Li S Z, Fang F. On the geographical distribution of the four kinds of pond-cultured carps in China [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1990, **36**(3): 244—250 [李思忠, 方芳. 鲢、鳙、青、草四大家鱼地理分布的研究. 动物学报, 1990, **36**(3): 244—250]
- [2] Welcomme R L. International Introductions of Inland Aquatic Species [M]. FAO Fisheries Department. 1988
- [3] Cudmore B, Mandrak N E. Biological synopsis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [M]. Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences. 2004, 2705
- [4] Mitchell A J, Kelly A M. The public sector role in the establishment of grass carp in the United States [J]. *Fisheries*, 2006, **31**(3): 113—121
- [5] Wu L Z, Wang Z. Biochemical genetic structure and variation in a natural population of grass carp from the middle reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1992, **19**(3): 221—227 [吴力钊, 王祖. 长江中游草鱼天然种群的生化遗传结构及变异. 遗传学报, 1992, **19**(3): 221—227]
- [6] Zhao J L, Li S F. Isoenzyme analysis of population divergence of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1996, **20**(2): 104—110 [赵金良, 李思发. 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼种群分化的同工酶分析. 水产学报, 1996, **20**(2): 104—110]
- [7] Li S F, Lü G Q, Bernatchez L. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, **44**(1): 82—93 [李思发,

- 吕国庆, L. 贝纳切滋. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析. 动物学报, 1998, **44**(1): 82—93
- [8] Wu H F, Dong S, Shan Q. PCR-RFLP analysis of mtDNA D-loop region of three populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Fisheries Science*, 2006, **25**(4): 184—188 [吴海防, 董仕, 单洪. 3 个群体草鱼 mtDNA D-Loop 的 PCR-RFLP 分析. 水产科学, 2006, **25**(4): 184—188]
- [9] Zhang S M, Deng H, Wang D Q. Population structure and genetic diversity of silver carp and grass carp from populations of Yangtze River system revealed by RAPD [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**: 324—330 [张四明, 邓怀, 汪登强. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究. 水生生物学报, 2001, **25**: 324—330]
- [10] Zhang F, Mi Z Y, Mao Z R, et al. Cloning and structure analysis of the mitochondrial control region and its flanking tRNA genes from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, **15**(3): 417—422 [张方, 米志勇, 毛钟荣, 等. 草鱼线粒体控制区及两侧 tRNA 的序列的克隆与结构分析. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, **15**(3): 417—422]
- [11] Ye X, Bai J J, Lao H H. Clone and characterization of mitochondrial cytochrome *b* gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(3): 193—197 [叶星, 白俊杰, 劳海华. 草鱼线粒体细胞色素 *b* 基因的克隆与序列分析. 中国水产科学, 2002, **9**(3): 193—197]
- [12] Liao X L, Yu X M, Tan D Q. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 113—119 [廖小林, 俞小牧, 谭德清. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 113—119]
- [13] Zheng K, Lin K, Liu Z H. Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang River group [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, **34**(4): 321—330
- [14] Li S F, Wu L Z, Wang Q. Comprehensive genetic study on Chinese carps [M]. Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1990 [李思发, 吴力钊, 王强. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究. 上海科学技术出版社. 1990]
- [15] Xue G X, Liu J, Liu H. RAPD analysis of grass carp population in three-river waters [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, **5**(1): 1—5 [薛国雄, 刘棘, 刘浩. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析. 中国水产科学, 1998, **5**(1): 1—5]
- [16] Mitchell C P. Control of water weeds by grass carp in two small lakes [J]. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research*, 1980, **14**(4): 381—390
- [17] Mine U Kırkağaç, Demir N. The effects of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val., 1844) on water quality, plankton, macrophytes and benthic macroinvertebrates in a spring pond [J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2006, **6**: 7—15
- [18] Standish K, Allen Jr, Wattendorf R J. Triploid grass carp: status and management implications [J]. *Fisheries*, Vol, 1987, **12**(4): 20—24
- [19] Mccarter N H. Verification of the production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with hydrostatic pressure [J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1988, **22**: 501—505
- [20] Kirk J P, Killgore K J. Movements of triploid grass carp in the Cooper River, South Carolina [J]. *Aquat. Plant Manage*, 2001, **39**: 59—62
- [21] Wang C H, Chen Q, Lu G Q. Complete mitochondrial genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Teleostei): Insight into its phylogenetic position within Cyprinidae [J]. *Gene*, 2008, **424**(1): 96—101
- [22] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl. Acid. Symp. Ser*, 1999, **41**: 95—98
- [23] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic. Acids. Res*, 1994, **22**: 4673—4680
- [24] Barker F K, Lutzoni F M. The utility of the incongruence length difference test [J]. *Syst. Biol*, 2002, **51**(4): 625—637
- [25] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: a software for population genetics data analysis. Vers. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, Univ. of Geneva. 2000
- [26] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, **123**: 585—595
- [27] Tamura K, Dudley J, Nei M. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol. Biol. Evol*, 2007, **24**, 1596—1599
- [28] Clement M, Posada D, Crandall K A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. *Molecular Ecology*, 2000, **4**: 79—88
- [29] Beerli P, Felsenstein J. Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach [J]. *Genetics*, 1999, **152**(2): 763—773
- [30] Zhou Q, Wang W. Detecting natural selection at the DNA level [J]. *Zoological Research*, 2004, **25**(1): 73—80 [周琦, 王文. DNA 水平自然选择作用的检测. 动物学研究, 2004, **25**(1): 73—80]
- [31] Zhang S M, Wang D Q, Deng H. Mitochondrial DNA variations of silver carp and grass carp in populations of the middle reaches of the Yangtze River revealed by using RFLP-PCR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(2): 142—147 [张四明, 汪登强, 邓怀. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 142—147]

GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) GENETIC STRUCTURE ANALYSIS AMONG NATIVE POPULATIONS IN CHINA AND INTRODUCED POPULATIONS IN USA, EUROPE AND JAPAN BASED ON MITOCHONDRIAL SEQUENCE

SONG Xiao, LI Si-Fa, WANG Cheng-Hui, XU Jia-Wei and YANG Qin-Ling

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) is one of the most important freshwater species in aquaculture. Meanwhile, the grass carp is originally distributed in China, and then it has been introduced into more than 100 countries for aquatic weed control and aquaculture since 1960s. In the past five decades, the grass carps have been adapted to the local environment and developed local groups. However, the genetic variation among the grass carps in native and introduced regions, as well as the genetic phylogeny, is not clear. Meanwhile, there is no available literature to clarify which river systems in China are the most likely origins of colonized populations in introduced regions. In this study, partial sequences of the mitochondrial D-Loop (764bp), COII + tRNA (719bp) were analyzed from native (the Yangtze, Amur and Pearl Rivers in China) and introduced (the Danube River in Hungary, the Mississippi River in USA and the Tonegawa River in Japan) populations of the grass carp. The data of the two mtDNA fragments showed no conflict with the ILD (Incongruence Length Difference) test ($p = 0.42$), and they could combine together as one data. The results indicated that there were a total of 32 haplotypes in all specimens, and 5 haplotypes were shared, all other haplotypes were singletons. In the 5 shared haplotypes, one was found in all populations, one in Amur River and Pearl River, two in China and Hungary, and the last one was found only in China. The genetic variation in the native populations was higher than that in the colonized populations. In the native populations, the genetic diversity ordered as the Pearl Rivers ($\pi = 0.0042$) > Yangtze River ($\pi = 0.0028$) > Amur River ($\pi = 0.0013$). In the introduced populations, the genetic diversity ordered as the Danube River ($\pi = 0.0019$) > Mississippi River ($\pi = 0.0010$) > Tonegawa River ($\pi = 0.0001$). The analysis of AMOVA using Arlequin 3.01 indicated that the variation mostly existed within populations (77.27%), but it was very low contribution from the sampling regions (0.38%). The pairwise F_{ST} values demonstrated that there was a significant differentiation in most pairwise populations. The Tajima's D values were significant negative in the populations of the Amur River and Mississippi River (marginally significant in Tonegawa River), which demonstrated the recent population expansion in their histories, and were positive in the other populations. Based on the software TCS 1.21, the haplotype network showed that the Yangtze River population would be the most original and then expanded to other rivers. Based on the base composition, transition/transversion values from the software MEGA4, the gene flow among populations using the software Migrate-2.4.3 showed that the Danube River population and the Tonegawa River population might have two origins from China, namely the Yangtze and Amur River, the Mississippi River population might have three origins, the Yangtze, Amur and Pearl Rivers. The gene flow gave a sign that all grass carp populations would be derived from the Yangtze River, which is in agreement with the results of the haplotype network.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; Native populations; Introduced populations; mtDNA; Genetic variation