

大鳞副泥鳅 7 个群体遗传变异的微卫星分析

游翠红^{1,2}, 童金苟¹, 俞小牧¹(1. 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;
2. 汕头大学海洋生物研究所, 广东 汕头 515063)

摘要: 利用泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 的微卫星引物跨种扩增大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) , 通过家系扩增、PCR 产物测序筛选出 6 个座位, 用于大鳞副泥鳅 7 个野生群体的遗传结构分析。结果显示, 群体的平均等位基因数在 3.167 ~ 4.833, 平均观测杂合度 (H_o) 在 0.248 ~ 0.417, 平均期望杂合度 (H_e) 在 0.379 ~ 0.505, 多个座位存在零等位基因、杂合子缺失现象, 显示大鳞副泥鳅种群遗传多样性较低。采用 UPGMA 法对 7 个群体基于 D_A 遗传距离进行聚类, 可分为 4 类, 位于长江中下游的沙市、澧县、武汉、鄱阳湖群体先聚为一类, 后与石首群体聚类, 最后与珠江水系的广州群体聚类, 而位于长江上游的泸州群体则单独聚为一类。群体的 F_{st} 统计量为 0.2987, 表明群体间存在显著的遗传分化, 主要由泸州群体与其它地区群体间的遗传分化引起。

关键词: 大鳞副泥鳅; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 3075 (2012) 01 - 0084 - 08

大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes)、鳅科 (Cobitidae)、副泥鳅属 (*Paramisgurnus*) , 其外部形态与泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 极为相似, 俗称“红泥鳅”, 主要分布于我国长江中下游流域与台湾地区, 具有极高的食用价值和药用价值, 是我国重要的小型经济鱼类, 主要与泥鳅一起出口至日本、韩国等地。近年来, 由于捕捞强度的增加, 其野生资源量正在逐渐减少。充分了解大鳞副泥鳅的种质资源现状, 对其保护和开发具有重要意义; 此外, 李康等 (1983) 观察到湖北沙市地区大鳞副泥鳅群体存在染色体数目为 48 与 49 的两个种群, 部分个体增加了一条端部着丝粒染色体。因此, 有必要进一步探讨沙市地区群体是否存在种群亚分化的问题。

本研究采用在真核生物基因组中分布广泛、呈共显性遗传的微卫星分子标记, 分析长江流域与珠江水系共 7 个地区大鳞副泥鳅野生群体的遗传多样性与遗传分化, 以期为大鳞副泥鳅种质资源的评估、保护和持续利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集及总 DNA 的提取

大鳞副泥鳅野生样品采自长江水系和珠江共 7 个地区, 分别是四川省泸州 (Luzhou, 30 尾)、湖北省荆州市的沙市 (Shashi, 39 尾) 和石首 (Shishou, 29 尾)、武汉 (Wuhan, 40 尾)、湖南省澧县 (Lixian, 32 尾)、江西省鄱阳湖 (Poyanghu, 30 尾) 及广东省广州 (Guangzhou, 22 尾), 共计 222 尾个体。依据大鳞副泥鳅的胸鳍基部是否存在突起等特征来鉴定雌雄, 剪尾鳍保存于 95% 乙醇中; 此外, 在繁殖季节采用人工授精的方法获得大鳞副泥鳅全同胞自交家系 2 个。从每个家系中各取 30 ~ 50 尾 7 日龄子代, 用 95% 乙醇固定备用。成鱼尾鳍与幼鱼总 DNA 的提取参照萨姆布鲁克和拉舍尔 (2002) 的酚·氯仿·异戊醇方法, 稍加修改。

1.2 PCR 扩增及凝胶电泳

微卫星位点的引物来自已发表的 15 对泥鳅引物序列 (*Mac2* ~ *Mac4*、*Mac9*、*Mac11*、*Mac15*、*Mac24*、*Mac35* ~ *Mac37*、*Mac40*、*Mac44* ~ *Mac45*、*Mac49* ~ *Mac50*) (Morishima et al, 2001), 由上海生工生物工程有限公司合成。经 PCR 筛选后扩增大鳞副泥鳅群体。有价值的引物应符合在大鳞副泥鳅样品中扩增清晰、稳定、多态性高, 并且在其自交家系中扩增符合孟德尔遗传。PCR 反应总体积为 12.5 μ L, 包括 10 ~ 50 ng DNA, 1 \times PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl),

收稿日期: 2011 - 09 - 11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370225); 973 项目 (2010CB126305); 农业部专项课题 (200903045, 2011-G12); FEBL 课题 (2011FBZ20)。

通讯作者: 童金苟。E-mail: jgtong@ihb.ac.cn

作者简介: 游翠红, 1976 年生, 女, 博士, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: chyout@stu.edu.cn

120 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$ 引物和 0.5U *Taq* 酶 (BioStar)。

PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。取 4~6 μL PCR 产物进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳缓冲液为 1 \times TBE, 电压为 10 V/cm。电泳完毕后, 凝胶采用溴化乙锭溶液 (EB) 染色, 凝胶成像系统 (SYNGENE, USA) 照相。选取同一座位基因型不同个体的 PCR 产物集中在一块凝胶上, 按照上述条件进行电泳分离, 通过与分子量标记 pBR322 DNA/*Msp* I 比较来判读等位基因大小。

1.3 PCR 产物测序

采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 切下目标电泳条带, 用商品试剂盒 (武汉柏傲生物工程技术有限公司) 纯化。纯化产物用 T4 DNA 连接酶连接到 pMD18-T 质粒 (TaKaRa) 上, 转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布含 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素 LB 平板 (含有 X-Gal 与 IPTG), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑选阳性单克隆菌落送上海联合基因生物技术公司测序。

1.4 数据统计

利用 FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002) 进行种群遗传分析, 计算 7 个群体在各个位点的等位基因数目 (Number of allele, A)、有效等位基因数目 (也称等位基因丰富度, Allelic richness, A_r) 及固定指数 (Fixation index, F_{is})。用 ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al, 2005) 计算观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e), 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验及位点间连锁不平衡 (Linkage disequilibrium) 分析。采用 Microchecker 2.2.3 检测群体内是否存在零等位基因 (Null allele)。位点的多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 采用相关公式计算 (Botstein et al, 1980)。

通过种群的突变-漂移平衡 (Mutation-drift equilibrium) 分析来估计种群数量动态变化。根据各位点的等位基因频率, 基于无限等位基因模型 (Infinite allele model, IAM)、逐步突变模型 (Stepwise mutation model, SMM) 和双相突变模型 (Two-phased model of mutation, TPM), 利用 Bottleneck 3.4 (Cornuet & Luikart, 1997) 计算平均期望杂合度 (Expected average heterozygosity, H_{EQ}), 并设置 1 000 次重复,

通过标记检验 (Sign test) 与 Wilcoxon 标记秩检验 (Wilcoxon sign-rank test) 分析群体杂合过剩是否显著, 以检测群体是否经历过遗传瓶颈。群体间遗传关系分析采用 ARLEQUIN 3.5 软件, 分别计算方差分析 (AMOVA)、 F -统计量 (F -Statistics) 及群体间遗传分化指数 (Pairwise F_{st}), 并进行群体间遗传分化检验。两两群体间 Nei's 遗传距离 (Genetic distance, D_A) (Nei et al, 1983) 采用 DISPAN 计算, 并基于 D_A 遗传距离用 MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007) 构建 UPGMA 系统树。

2 结果

2.1 大鳞副泥鳅微卫星位点克隆与筛选

通过对大鳞副泥鳅 6 个个体 DNA 的扩增分析, 从 15 对泥鳅微卫星引物中共筛选到 6 对扩增清晰、呈多态性的引物, 分别是 *Mac9*、*Mac15*、*Mac37*、*Mac45*、*Mac49* 和 *Mac50*。这 6 对引物在大鳞副泥鳅 2 个自交家系中的扩增均符合孟德尔遗传 (图略)。进一步将这些位点的 PCR 产物测序, 结果显示, 这 6 个位点均含有以 CA/GT 二碱基为重复单元的多重复单元, 分别为 (CA/GT) $_6$ -(CA/GT) $_7$ 、次重复 (图 1)。将这些序列投递到 GenBank, 获得序列号 HQ644146、HQ650142-HQ650146, 依次命名为大鳞副泥鳅 *Pdab9*、*Pdab15*、*Pdab37*、*Pdab45*、*Pdab49* 和 *Pdab50* (表 1)。这 6 个微卫星位点可以用于大鳞副泥鳅群体遗传分析。

2.2 大鳞副泥鳅群体内遗传变异

在大鳞副泥鳅 7 个地区群体中, 共检测到 46 个等位基因, 平均每个位点检测出 8 个等位基因; 位点的多态信息含量 PIC 在 0.2880~0.7946, 属于中度到高度多态位点 (表 1)。

7 个群体的遗传多样性参数见表 2。等位基因数目 A 在 3.167~4.833, 有效等位基因数 A_r 在 3.127~5.833, 等位基因数最少的为泸州群体, 最多的为广州群体。群体期望杂合度 H_e 在 0.379~0.505, 最低的为澧县群体和鄱阳湖群体, 最高的为广州群体, 平均值为 0.417。群体观察杂合度 H_o 在 0.248~0.417, 最低的为沙市群体, 最高的为泸州群体, 平均值为 0.323。广州群体的等位基因数目 A 及观测杂合度 H_o 均为最大。由此可见, 广州群体的遗传多样性水平高于其它地区群体, 且大鳞副泥鳅整个种群的遗传多样性水平较低。

Pdab9 (86bp)

ATAATGGTCTCCAGTGCTTTTAATTAGGCTCATTACACACAGACACACACACATTC
AGTATCCGTCTATTAGCGTAGCAGCACTA

Pdab15 (152bp)

TCATTAGTGAGGACACAATGTTTTTATACAGTACTTGGACAATGATATCAACTGTACT
CCTACTTTGTGACACTTTTGTCTACAACCTTCAAACAAACACATACTTGCATTAATAG
ACCGACACACACACACAACAAGAACCGTGAAACATTC

Pdab37 (84bp)

GCAAGTACATGCTCATCCTTAAACACACACACACACACAGCTCGGAGGCCTGGTGC
TGAGCTAAGATGTAAGGAATGCAGGTGA

Pdab45 (80bp)

TGGGTGTTCAATTTTTATCCCCTTCCACACCAATCACACACACACAAACACTCTTTTCT
CCTGCTAAAGCCGTAAGCA

Pdab49 (85bp)

CTGCAGGACACTTCAAACAGAATAACAATCACACACACACACACATTATGCTAC
TGTTCGAATGTTTGCACACTGTTGCGA

Pdab50 (103bp)

TCATCTCCTCACTCGTGATAACACACTCTGTGTATATTACATACACACACACGCAC
ATACTGTAAGATGTGGGATGAGAAGTTGGATACAGTAAATCCAGAA

(□表示引物序列, _表示重复区)

图1 大鳞副泥鳅6个微卫星位点PCR产物的核酸序列

(□ indicates primer sequence, _ indicates repeat region)

Fig. 1 Nucleotide sequences of PCR products in *P. dabryanus* in 6 microsatellite loci

表1 大鳞副泥鳅6个微卫星位点的扩增与种群多态性

Tab. 1 Amplification and polymorphism of *P. dabryanus* in six microsatellite loci

座位	引物 序列	退火温度/ °C	核心重复 序列	等位基 因数	多态信息含量 (PIC)	GenBank accession
<i>Pdab9</i>	5'-CAGTGCTGCTACGCTAATAG-3' 5'-ATAATGGTCTCCAGTGCTTT-3'	52	(CA) ₄ -GA-(CA) ₅	5	0.288	HQ644146
<i>Pdab15</i>	5'-GAATGTTTCACGGTCTTCTGT-3' 5'-CATTAGTGAGGACACAATGT-3'	56	(CA) ₇	9	0.635	HQ650142
<i>Pdab37</i>	5'-GCAAGTACATGCTCATCCTT-3' 5'-CACCTGCATTCTTACATCT-3'	60	(CA) ₈	11	0.795	HQ650143
<i>Pdab45</i>	5'-GTTCACTACGGCTTACGAG-3' 5'-TGGGTGTTCAATTTTTATCCC-3'	52	(CA) ₆	5	0.310	HQ650144
<i>Pdab49</i>	5'-CGCAACAGTGTGCAAACATT-3' 5'-CTGCAGGACACTTCAAACAG-3'	55	(CA) ₉	12	0.707	HQ650145
<i>Pdab50</i>	5'-TTCTGGATTACTGTATCCA-3' 5'-TCATCTCCTCACTCGTGATA-3'	52	(CA) ₄ -CG-(CA) ₂	4	0.475	HQ650146

固定指数 F_{is} 表明(表2)除泸州群体外,其他6个地区群体均表现为杂合子缺失($F_{is} > 0$);其中,沙市、武汉、石首、广州4个地区群体呈现显著的杂合子缺失($P < 0.001$)。标记检验与 Wilcoxon 标记秩检验表明(表3)在IAM与IPM假设下,7个地区群体杂合过剩位点数目与杂合不足位点数目之间没有显著差异,各群体均处于突变-漂移平衡状态,总种群也处于突变-漂移平衡状态;在SMM假设下,仅武汉群体显著地偏离了突变-漂移平衡,总种群也显著地偏离突变-漂移平衡,杂合不足位点数目显

著地多于杂合过剩位点数目。

Hardy-Weinberg平衡检验表明(表4),各群体至少有2个位点偏离Hardy-Weinberg平衡($P < 0.05$)。广州群体在所有位点均偏离Hardy-Weinberg平衡;在*Pdab37*、*Pdab49*位点,几乎所有群体均偏离Hardy-Weinberg平衡(泸州群体在*Pdab37*位点除外)。此外,澧县群体在*Pdab9*位点、鄱阳湖群体在*Pdab9*与*Pdab45*位点、泸州群体在*Pdab50*位点呈现单态,所有个体均为纯合子。零等位基因检测发现,仅鄱阳湖群体没有检测到零等位

表 2 大鳞副泥鳅 7 个群体的遗传多样性

Tab. 2 Summary statistics analysis of genetic diversity of seven populations of *P. dabryanus*

群体	参数	<i>Pdab9</i>	<i>Pdab15</i>	<i>Pdab37</i>	<i>Pdab45</i>	<i>Pdab49</i>	<i>Pdab50</i>	平均值
沙市	<i>A</i>	2	5	9	2	8	2	4.667
	<i>A_r</i>	1.564	4.293	7.902	2.000	7.389	2.000	4.191
	<i>H_o</i>	0.026	0.256	0.564	0.051	0.462	0.128	0.248
	<i>H_e</i>	0.026	0.279	0.779	0.298	0.721	0.207	0.385
	<i>F_{is}</i>	0	0.083	0.278*	0.830*	0.363*	0.383	0.359*
武汉	<i>A</i>	3	5	7	3	8	2	4.667
	<i>A_r</i>	2.513	4.264	5.863	2.549	7.548	2.000	4.123
	<i>H_o</i>	0.075	0.575	0.575	0.025	0.525	0.300	0.346
	<i>H_e</i>	0.120	0.496	0.705	0.205	0.741	0.425	0.449
	<i>F_{is}</i>	0.378	-0.161	0.186	0.879*	0.294	0.297	0.232*
石首	<i>A</i>	3	4	8	2	8	2	4.500
	<i>A_r</i>	2.933	3.756	7.692	1.945	7.632	2.000	4.326
	<i>H_o</i>	0.172	0.414	0.655	0.000	0.414	0.241	0.316
	<i>H_e</i>	0.164	0.358	0.819	0.068	0.736	0.422	0.428
	<i>F_{is}</i>	-0.053	-0.161	0.203	1.000	0.442*	0.432	0.264*
澧县	<i>A</i>	1	5	9	2	7	2	4.333
	<i>A_r</i>	1.000	4.591	8.841	1.906	6.592	1.998	4.155
	<i>H_o</i>	NA	0.563	0.688	0.063	0.500	0.156	0.328
	<i>H_e</i>	NA	0.476	0.839	0.061	0.753	0.146	0.379
	<i>F_{is}</i>	NA	-0.185	0.183	-0.016	0.340	-0.069	0.137
鄱阳湖	<i>A</i>	1	4	9	1	9	2	4.333
	<i>A_r</i>	1.000	3.717	8.648	1.000	8.733	1.999	4.183
	<i>H_o</i>	NA	0.400	0.767	NA	0.714	0.167	0.341
	<i>H_e</i>	NA	0.408	0.864	NA	0.846	0.155	0.379
	<i>F_{is}</i>	NA	0.020	0.114	NA	0.158	-0.074	0.101
广州	<i>A</i>	3	6	6	2	8	4	4.833
	<i>A_r</i>	9.000	6.000	6.000	2.000	8.000	4.000	5.833
	<i>H_o</i>	0.045	0.409	0.318	0.000	0.455	0.364	0.265
	<i>H_e</i>	0.132	0.589	0.759	0.304	0.684	0.558	0.504
	<i>F_{is}</i>	0.661	0.311	0.586*	1.000*	0.341	0.354	0.480*
泸州	<i>A</i>	4	2	4	4	4	1	3.167
	<i>A_r</i>	4.000	2.000	3.864	3.984	3.915	1.000	3.127
	<i>H_o</i>	0.967	0.467	0.467	0.333	0.267	NA	0.417
	<i>H_e</i>	0.721	0.364	0.427	0.537	0.300	NA	0.392
	<i>F_{is}</i>	-0.348	-0.289	-0.094	0.383	0.113	NA	-0.065

注: * 经 Bonferroni 校正后差异极显著 ($P < 0.001$)。

Note: * indicates significant difference after Bonferroni correction ($P < 0.001$).

表 3 大鳞副泥鳅 7 个群体突变 - 漂移平衡分析

Tab. 3 Departure from mutation-drift equilibrium of seven populations of *P. dabryanus*

群体	数目	Sign test						Wilcoxon sign-rank (two-tailed)		
		IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
		<i>He/Hd</i>	Prob	<i>He/Hd</i>	Prob	<i>He/Hd</i>	Prob	Prob	Prob	Prob
沙市	39	4/2	0.3562	1/5	0.0874	1/5	0.0792	1.0000	0.0781	0.0469*
武汉	40	3/3	0.6017	1/5	0.0586	1/5	0.0499*	1.0000	0.1563	0.0313*
石首	29	3/3	0.6188	2/4	0.2502	2/4	0.2511	0.8438	0.4375	0.0781
澧县	32	2/3	0.4530	2/3	0.4188	1/4	0.1304	1.0000	0.2188	0.0625
鄱阳湖	30	2/2	0.6061	2/2	0.5918	2/2	0.5964	0.3125	0.8750	0.8750
广州	22	3/3	0.5648	3/3	0.5272	2/4	0.2073	0.8438	0.4375	0.0781
泸州	30	3/2	0.5702	3/2	0.6301	2/3	0.3768	0.6250	1.0000	0.6250
合计	222	4/2	0.4836	2/4	0.1896	0/6	0.0047*	0.5625	0.1094	0.0156*

注: *He/Hd* 为杂合过剩位点数与杂合不足位点数之比; * 表示显著偏离突变 - 平衡水平 ($P < 0.05$)。

Note: *He/Hd* means the ratio of locus number of heterozygosity excess to that of heterozygosity deficiency; * means significant deviation of mutation - drift equilibrium ($P < 0.05$).

基因,而沙市、武汉、石首、澧县、广州5个地区群体至少在2~3个位点检测到零等位基因,广州群体在所有位点均存在零等位基因。此外,检测到石首群体在 *Pdab45* 与 *Pdab49* 位点、*Pdab45* 与 *Pdab37* 位点之间的基因型连锁不平衡显著 ($P < 0.05$)。广州群体在 *Pdab37* 与 *Pdab9* 位点、*Pdab37* 与 *Pdab49* 位点之间的基因型连锁不平衡显著 ($P < 0.05$)。其它群体未检测到位点间的基因型连锁不平衡状况。

表4 大鳞副泥鳅7个群体偏离 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab.4 Test of the deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium of seven *P. dabryanus* populations

群体	<i>Pdab9</i>	<i>Pdab15</i>	<i>Pdab37</i>	<i>Pdab45</i>	<i>Pdab49</i>	<i>Pdab50</i>
沙市	NS	NS	*	*	*	NS
武汉	NS	NS	*	*	*	NS
石首	NS	NS	*	NS	*	NS
澧县	NA	NS	*	*	*	*
鄱阳湖	NA	*	*	NA	*	NS
广州	*	*	*	*	*	*
泸州	*	NS	*	*	NS	NA

注: * 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$); NS 表示处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$); NA 为单态位点。

Note: * indicates significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$); NS indicates a locus is in the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$); NA indicates the locus is monomorphic.

2.3 大鳞副泥鳅群体间遗传分化

AMOVA 分析(表5)显示,大鳞副泥鳅群体 29.75% 遗传变异来自群体间,15.52% 来自群体内个体间,整个种群 F_{st} 统计量 F_{st} 为 0.2987,表明群体间遗传分化明显。两两群体之间相互比较显示(表6),泸州群体与其它地区群体间的遗传分化指数 F_{st} 明显大于其它地区群体之间的 F_{st} ;仅澧县群体与沙市群体、澧县群体与鄱阳湖群体之间遗传变异不显著 ($P > 0.05$),其它群体之间遗传变异均显著 ($P < 0.05$)。群体间遗传分化检验表明,泸州群体与其它地区群体之间均存在显著地遗传分化 ($P < 0.05$);且鄱阳湖群体与石首群体、鄱阳湖群体与广州群体之间也存在显著地遗传分化 ($P < 0.05$)。群体间 D_A 遗传距离(表6)最大的是泸州与澧县群体,为 0.722,最小的是澧县与沙市群体,为 0.029。根据 D_A 遗传距离构建系统树,UPGMA 聚类显示 7 个地区群体主要聚为 4 类,位于长江中下游的沙市、澧县、武汉、鄱阳湖群体遗传距离较小,首先聚类,后与石首群体聚类,最后与珠江水系的广州群体聚类,而位于长江上游的泸州群体单独聚为一类(图2)。

表5 大鳞副泥鳅7个群体的 AMOVA 分析结果

Tab.5 AMOVA analysis results of seven populations of *P. dabryanus*

变异来源	自由度	平方和	变异组成	变异百分数
群体间	6	208.24	0.53	29.75
群体内个体间	215	325.37	0.27	15.52
个体间	222	214.50	0.97	54.73
合计	443	748.11	1.77	

表6 大鳞副泥鳅群体间的遗传分化指数(对角线之下)与遗传距离(对角线之上)

Tab.6 Pairwise F_{st} estimates (F_{st} , below diagonal) and genetic distances (D_A , above diagonal) between *P. dabryanus* populations

群体	沙市	武汉	石首	澧县	鄱阳湖	广州	泸州
沙市	-	0.043	0.133	0.029	0.062	0.179	0.717
武汉	0.035*	-	0.140	0.055	0.073	0.150	0.646
石首	0.229*	0.178*	-	0.130	0.148	0.227	0.650
澧县	0.017	0.052*	0.202*	-	0.054	0.177	0.722
鄱阳湖	0.030*	0.039*	0.213*	0.007	-	0.204	0.710
广州	0.200*	0.119*	0.241*	0.213*	0.210*	-	0.591
泸州	0.572*	0.511*	0.537*	0.577*	0.582*	0.476*	-

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * indicates significant difference ($P < 0.05$).

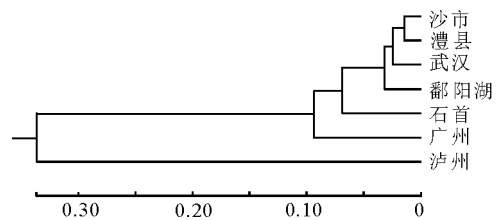


图2 基于 D_A 遗传距离构建的 UPGMA 聚类树

Fig.2 UPGMA dendrogram based on D_A genetic distance

3 讨论

3.1 大鳞副泥鳅群体的遗传多样性

大鳞副泥鳅与泥鳅亲缘关系很近,从形态上较难区分(陈景星,1981)。本文利用泥鳅微卫星位点的引物跨种扩增 大鳞副泥鳅。测序结果显示,大鳞副泥鳅与泥鳅除在 *Pdab9* 座位的引物区有 1 个碱基发生颠换外,其它 5 个座位的引物区核苷酸序列完全一致,并且重复单元都是 CA/GT 二碱基重复,表明这些微卫星引物在大鳞副泥鳅中的通用性很高,同时这些座位的高度同源性进一步证实了 2 种泥鳅的近缘关系。目前针对大鳞副泥鳅的研究,主要集中在生态养殖及性别决定方面(常重杰和余其兴,1997;张刚,2004;You et al,2008);关于大鳞副泥鳅群体遗传多样性分析的报道很少。李殿香等(2003)利用 RAPD 分析了南四湖泥鳅和大鳞副泥

鳅群体,发现大鳞副泥鳅种群内具有较高的遗传相似性,推测是由于南四湖的环境恶化导致大鳞副泥鳅遗传多样性的降低;常重杰等(2001)研究了河南延津、湖北武汉、广西桂林泥鳅和大鳞副泥鳅群体遗传多样性,发现了类似现象;同样的现象也见于鄱阳湖地区泥鳅属的3个泥鳅群体(曾柳根等,2008)。本次研究中,大鳞副泥鳅群体平均等位基因数目为4.357、平均期望杂合度为0.417,均小于基于13种淡水鱼类统计得出的平均等位基因数7.5个、平均杂合度0.46(DeWoody & Avise, 2000)。期望杂合度、观测杂合度和等位基因数目是评价群体遗传多样性指标(闰路娜和张德兴,2004),本研究所获得的结果进一步证实了大鳞副泥鳅种群遗传多样性处于较低水平。

3.2 大鳞副泥鳅群体的遗传平衡

一个物种如果近期产生遗传瓶颈效应,将导致遗传多样性的降低。本研究采用标记检验与Wilcoxon标记秩检验,通过检测各地区群体是否存在显著多的杂合过剩位点数来判断群体是否经历遗传瓶颈效应而导致偏离突变-漂移平衡(Maruyama & Fuerst, 1985; Cornuet & Luikart, 1997)。在最适合微卫星数据分析的TPM假设模型下(Spencer et al, 2000);2种检验均显示大鳞副泥鳅7个地区群体杂合过剩位点数与杂合不足位点数之间没有显著差异,表明其群体近期均没有遗传瓶颈;此外,各地区群体的等位基因数目 A 与基因丰富度 A_r 大致相当,提示在各个地区群体中等位基因分布均匀、稀有等位基因没有明显丢失,进一步证实大鳞副泥鳅种群在近期没有经历过遗传瓶颈效应(Kohlmann et al, 2003)。

固定指数 F_{is} 是检验群体杂合子缺失或过剩的指标。大鳞副泥鳅除泸州群体之外,其它6个地区群体均呈现杂合子缺失,其中4个群体呈现显著的杂合子缺失现象,暗示杂合子缺失是导致大鳞副泥鳅种群遗传多样性低的一个原因。杂合子缺失可能与自然选择、自交、零等位基因、Wahlund效应和性连锁座位等相关(Zouros & Foltz, 1984)。当杂合子严重缺失即 F_{is} 明显偏离0时,会引起群体显著地偏离Hardy-Weinberg平衡。本次研究中,7个地区群体分别在2~6个位点偏离Hardy-Weinberg平衡,且在多个位点检测到零等位基因,揭示零等位基因的存在可能是引起大鳞副泥鳅群体杂合子缺失、偏离Hardy-Weinberg平衡的一个重要因素;此外,大鳞副泥鳅两两群体间遗传分化指数 F_{st} 差异明显,且群体

间存在显著的遗传分化($F_{st} = 0.2987$)提示不同地区的大鳞副泥鳅群体间遗传变异显著,其种群可能发生了遗传漂变。部分群体在某些位点检测到基因型连锁不平衡现象,但这种现象并不适用于所有群体;因此6个微卫星位点在大鳞副泥鳅基因组中的分布仍是随机的,但连锁不平衡现象也可能暗示部分地区的大鳞副泥鳅群体存在选择效应(樊龙江, 2010)。

3.3 大鳞副泥鳅群体的遗传分化

大鳞副泥鳅属杂食性小型鱼类,自身迁移能力有限,地理距离、自然屏障的隔离、遗传漂变、自然选择及缺乏基因流等都有可能群体会导致群体间产生较大的遗传变异,呈现显著地遗传分化。大鳞副泥鳅 $F_{st} = 0.2987$,群体间的遗传分化非常明显,最主要的群体遗传分化发生在泸州群体与其它地区群体之间。泸州群体虽然杂合度高,但等位基因数目最少,基因型单一,推测是由于遗传漂变固定下来的某些等位基因对于环境的适合度较高而经历适应性选择呈现高的基因频率,进而产生与其它地区群体显著不同的遗传结构(樊龙江, 2010)。其它的群体之间,如鄱阳湖与广州群体、鄱阳湖与石首群体间也存在显著的遗传分化。从聚类结果上看,泸州群体地处长江上游,与其它地区群体间因地理距离遥远而缺乏基因交流,使得它与其它地区群体间遗传距离最大,在聚类图上聚成最远的一支;广州群体从属珠江水系,与长江水系的6个地区群体间也存在天然屏障,在聚类图上聚成单独的一支;长江中下游5个地区群体地理位置临近,均处于长江干流或与干流相通,基因交流的机会较大,故基本聚在一起;其中,鄱阳湖、武汉、澧县、沙市4个地区群体之间遗传距离较近。由此可见,大鳞副泥鳅地区群体间的遗传分化水平仍然属于地理分化。在日本的泥鳅中,大多数地区群体也呈现类似程度的遗传分化现象(Khan & Arai, 2000)。

本次研究的目之一是试图探讨大鳞副泥鳅染色体数目有变异的沙市群体与其它地区群体间的遗传变异程度、是否有分化成2个亚种的趋势(李康等, 1983)。日本不同地区发现存在不同倍性的泥鳅群体,如二倍体纯系泥鳅、自然三倍体泥鳅等,不同地区群体间呈现亚种水平、甚至种水平的遗传分化(Khan & Arai, 2000; Morishima et al, 2008)。本研究结果显示,沙市群体本身并无显著分化,该群体与其临近的澧县大鳞副泥鳅群体以及较远的其它群体之间的遗传变异水平也未表现出明显与地理分化所

不同的格局。推测过去报道的沙市地区部分种群增加的1条染色体可能是某一染色体断裂的结果,其造成的遗传物质的微小改变不足以引起该群体遗传结构的显著变化;当然,也有可能与研究使用的微卫星位点较少或由于沙市环境变迁导致未能采集到染色体数目有可能变异的样本等因素有关。

参考文献

- 常重杰,余其兴.1997.大鳞副泥鳅 ZZ/ZW 型性别决定的细胞遗传学证据[J].遗传,19(3):17-19.
- 常重杰,周容家,余其兴.2001.两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析[J].动物学报,47(1):89-93.
- 陈景星.1981.中国花鳅亚科鱼类系统分类的研究鱼类学论文集(第1集)[C].北京:科学出版社:21-32.
- 樊龙江.2010.生物信息学札记(第3版)[DB/OL]. Available from <http://ibi.zju.edu.cn/bioinplant/>.
- 李殿香,王金星,王来元.2003.南四湖泥鳅和大鳞副泥鳅随机扩增多态 DNA 分析报告[J].四川动物,22(1):6-9.
- 李康,李渝成,周嫩.1983.两种泥鳅染色体组型的比较研究[J].动物学研究 A(1):75-82.
- 闰路娜,张德兴.2004.种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响[J].动物学报,50(2):279-290.
- 曾柳根,甘云飞,王军花,等.2008.鄱阳湖区泥鳅的微卫星 DNA 多态性分析[J].南昌大学学报:理科版,32(1):84-88.
- 张刚.2004.泥鳅养殖技术之三:洪泽湖大鳞副泥鳅苗种规模化繁育技术[J].中国水产,(3):48-50.
- 萨姆布鲁克 J,拉舍尔 D W 著.黄培堂译.2002.分子克隆实验指南(第3版)[M].北京:科学出版社:461-471.
- Botstein D,White R L,Skolnick M et al.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet,32(3):31-34.
- Cornuet J M, Luikart. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data[J]. Genetics,144:2001-2014.
- Cornuet J M, Luikart G. 1997. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data[J]. Genetics,144:2001-2014.
- DeWoody J A, Avise J C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals[J]. J Fish Biol,56:461-473.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinform Online,1:47-50.
- Goudet J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2. 9. 3. 2) [DB/OL]. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Khan M R, Arai K. 2000. Allozyme variation and genetic differentiation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Fisheries Science 66:211-222.
- Kohlmann K, Gross R, Murakawa A, et al. 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers [J]. Aquatic Living Resources,16:421-431.
- Maruyama T, Fuerst P A. 1985. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck[J]. Genetics,111:675-689.
- Morishima K, Nakamura-Shiokawa Y, Bando E, et al. 2008. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses [J]. Genetica,132:159-171.
- Morishima K, Nakayama I, Arai K. 2001. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Genetica,111:59-69.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. J Molec Evol,19(3):153-170.
- Spencer C C, Neigel J E, Leberg P L. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks [J]. Molecular Ecology,9:1517-1528.
- Tamura K, Dudley J, Nei M et al. 2007. MEGA4. 0: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. Mol Biol Evol,24:1596-1599.
- You C, Yu X, Tan D Q, et al. 2008. Gynogenesis and sex determination in large scale loach, *Paramisgurnus dabryanus* (Sauvage) [J]. Aquaculture International,16:203-214.
- Zouros E, Foltz D W. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks [J]. Malacologia,25(2):583-591.

(责任编辑 万月华)

Microsatellite DNA Analysis on Genetic Diversity of Seven Populations of *Paramisgurnus dabryanus*

YOU Cui-hong^{1,2}, TONG Jin-gou¹, YU Xiao-mu¹

- (1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. Marine Biology Institute of Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: By using the microsatellite primers of pond loach *Misgurnus anguillicaudatus* to perform cross-species amplification of *Paramisgurnus dabryanus*, family amplification and PCR product sequencing, six loci were screened out to be suitable to the analyses of genetic diversity and population structure of seven wild populations of *P. dabryanus*. The average number of alleles, observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) ranged from 3.167 to 4.833, 0.248 to 0.417 and 0.379 to 0.505, respectively. These results showed that Null alleles and apparent deficiency of heterozygotes were detected at some loci, and the level of genetic diversity in *P. dabryanus* was relatively low. The cluster analysis by UPGMA method was carried out based on the D_A genetic distance of seven populations. The results showed that all populations comprised four groups: the separate Luzhou population (in the upper reaches of the Yangtze), the clustering population of Guangzhou (in the Zhujiang water system), the Shishou population, and Poyanghu population (including that of Shashi, Lixian, Wuhan, in the middle and lower reaches of the Yangtze River). The value of the F -statistics was 0.2987 and this suggested that *P. dabryanus* exhibited a significant genetic differentiation, mostly resulting from genetic differentiation of Luzhou and the other six populations.

Key words: *Paramisgurnus dabryanus*; microsatellite; genetic diversity