

微卫星标记分析乌江流域白甲鱼群体的遗传多样性

熊美华, 史方, 徐念, 阙延福, 杨钟, 胡菊香, 朱滨

(水利部中国科学院水工程生态研究所, 湖北武汉 430079)

摘要: 以乌江流域白甲鱼 (*Onychostoma sima*) 为材料, 构建了白甲鱼微卫星富集文库。对乌江彭水电站坝上、坝下种群进行 PCR 扩增, 得到 5 个多态位点, 其等位基因数目 3~6; 多态信息含量 0.4465~0.7116; 观测杂合度 0.4444~0.9310; 期望杂合度 0.4902~0.7624; Hardy-Weinberg 平衡偏离指数 -0.4171~0.2380, 各位点两两之间不存在显著的连锁不平衡现象。实验初步表明: 乌江流域白甲鱼的遗传多样性较为丰富, 但彭水电站的建立已经对其造成了一定程度的影响。

关键词: 白甲鱼; 微卫星; 遗传多样性; 乌江流域

中图分类号: Q346⁺.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2009)02-0122-04

乌江是长江右岸最大的支流, 全长 1 037 km, 总落差 2 124 m, 流域面积 87 920 km², 于重庆涪陵注入长江。乌江年径流量与黄河相当, 是我国 12 大水电基地之一, 被誉为“流着金子的河”。根据《乌江干流规划报告》, 乌江干流梯级开发包括普定、引子渡、洪家度、东风、索风营、乌江渡、构皮滩、思林、沙沱、彭水及银盘等 11 级。电站建成运行后, 各库区江段由急流生境变为缓流生境, 相应水生生物的种类组成朝着适应缓流或静水生境的方向演替。坝下生境条件也受到明显影响, 下泄水水温的变化可能较小, 但气体过饱和的影响比较大。另外, 径流调节特别是电站日调峰运行所导致的水文条件的改变对坝下江段水生生物及其生境的影响是十分显著的。同时, 电站的建立阻断了长江和坝下乌江江段与库区及库区以上河段之间鱼类遗传上的交流, 淹没了库区产卵场, 改变了坝下江段产卵场的水文条件。为了减小乌江急流生态环境被分割对鱼类造成的影响, 国家采取了相应的保护措施, 将影响区内的国家 II 级保护野生动物、重庆市重点保护的水生野生动物作为重点关注对象, 另将包括白甲鱼 (*Onychostoma sima*) 在内的在急流环境中产卵的 5 种经济鱼类一并作为近期关注对象, 在采取工程措施、栖息地保护措施、渔政管理措施的同时, 施以人工增殖放流措施进行资源量的补充。根据渔获物监测结果显

示, 白甲鱼野生种群数量减少, 另外由于白甲鱼人工繁殖已经取得成功, 2007 年在乌江干流开展了白甲鱼的人工放流。

人工繁殖放流是目前国际上比较普遍采用的珍稀、濒危物种保护方法, 前苏联持续多年对俄罗斯鲟及欧洲鳊人工繁殖放流, 使这些因水利工程建设导致的濒危物种得以保存, 其资源量逐步恢复 (Baranikova I A, 1987)。但是, 因人工繁殖放流的鱼类遗传背景单一, 经过长期的放流后, 物种自然种群的遗传多样性将可能崩溃, 遗传性状可能严重退化。因此, 在开展人工繁殖放流的同时, 需对该种的遗传多样性进行监测和分析, 并且评估人工繁殖对相应物种自然种群恢复的贡献率, 评价人工增殖效果。目前, 微卫星 (Microsatellite) 因其具有按照孟德尔方式遗传、多态信息含量丰富、呈共显性遗传、能用于简单快速的基因型检测等特点 (Weber J L, 1990), 这种标记技术已经被广泛应用于遗传多样性分析、遗传图谱构建、分子标记辅助育种以及亲子鉴定等研究 (徐宁迎等, 2000; 屈彦纯等, 2002; 韩春梅等, 2005; 汤青萍等, 2005; 耿波等, 2006)。本文利用乌江中白甲鱼样本构建微卫星文库, 优化并筛选多态性位点, 分析乌江白甲鱼群体遗传多样性, 为评价乌江干流电站对白甲鱼天然群体遗传结构的长期影响及白甲鱼人工增殖的效果提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用的白甲鱼样本分别采自于乌江彭水电站坝上坝下不同断面, 武隆、彭水、万足、鹿角、洪渡、淇滩, 其中武隆、彭水位于坝下, 其他位于坝上。

收稿日期: 2009-02-27

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30490234); 乌江彭水电站水生生物监测 (PS/HB011-2006)。

通讯作者: 朱滨。E-mail: zhubin@mail.ihe.ac.cn

作者简介: 熊美华, 女, 1982 年生, 湖北监利人, 研究实习员, 主要从事分子生态方面的研究。

所采取的白甲鱼鳍条样本于室温保存在无水乙醇中。

1.2 基因组 DNA 提取与微卫星富集文库构建

采用蛋白酶 K 酚氯仿法 (Sambrook J et al, 1989) 进行基因组 DNA 提取。按照 FIASCO 方法 (Fast isolation by AFLP of sequences containing repeats) (Zane L et al, 2002; Zhu B et al, 2005), 采用标有生物素的寡核苷酸探针 (AAAG)_n 构建微卫星富集文库。

1.3 引物设计及 PCR 条件的优化

用 TANDEM REPEATS FINDER (Benson G, 1999) 软件分析所获得的序列, 采用 Primer 5.0 软件 (张新宇和高燕宁, 2004) 设计引物, 共获得 9 对引物。用高盐法 (Aljanabi S M & Martinez I, 1997) 提取白甲鱼 DNA 标本做模板优化 PCR 条件。PCR 反应在 GeneAmp (ABI 9700) 仪中进行。10 μ L PCR 反应体系包括: 20 ~ 30 ng 基因组 DNA, 10 mmol/L Tris - HCl, 50 mmol/L KCl, 0.5 U Taq DNA polymerase (东盛科技有限公司)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 35 个循环包括 94 $^{\circ}$ C 40 s, 引物特有的退火温度 (表 1) 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物检测: 在 1 \times TBE 的电泳液中, 用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶在 35W 下电泳 3 h, ethidium bromide 染色, 再放入凝胶成像系统, 拍照并保存图片, 根据电泳结果显示的条带位置的不同确定其基因型, 并用 pBR 322 DNA/Msp I marker (TIANGEN) 为对照。再将优化好的微卫星引物用于坝上、坝下种群的 16 个个体基因组 PCR 扩增, 以检测分离到的位点是否能用于种群研究。

1.4 数据分析

微卫星位点的有效等位基因数目及大小使用 QUANTITY ONE version 4.62 (Bio-Rad Lab) 进行分析。期望杂合度、观测杂合度以及连锁不平衡 (LD) 等参数使用 POPGENE version 1.31 (Yeh F C et al, 1999) 软件进行分析, Hardy-Weinberg 平衡偏离指数 (D) 按以下公式计算: $D = (H_o - H_e) / H_e$ (王长忠等, 2008), 式中 H_e 为期望杂合度, H_o 为观测杂合度。多态信息含量按 Bostein 等 (1980) 的公式计算:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i^2 P_j^2$$

其中 P_i 和 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, m 为等位基因数。

无效等位基因使用 MICRO-CHECHER (Oosterhout C V et al, 2004) 软件来检测。

2 结果

在所设计的 9 对引物中, 5 对引物扩增出了清晰并且具有多态性的 PCR 产物。这 5 对引物共扩增出 21 个等位基因, 每个位点的等位基因数目 3 ~ 6 个不等, 平均等位基因数目 4.2; 多态信息含量 0.4465 ~ 0.7116, 平均值 0.6027。每个位点的观测杂合度 0.4444 ~ 0.9310, 平均值 0.6253; 期望杂合度 0.4902 ~ 0.7624, 平均值 0.6669。Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D) - 0.4171 ~ 0.2380, 位点 OS2 出现了杂合子过剩现象, 而位点 OS11、OS21 出现了缺失。所有位点中没有检测到连锁不平衡。位点的引物序列、重复单元以及其他信息见表 1。

表 1 白甲鱼 5 个微卫星位点的特性

Tab. 1 Characteristics of 5 microsatellite loci in *O. sima*

位点 Locus	核心序列 Repeat motif	引物序列 Primer Sequence (5' - 3')	等位基因数 No. of alleles	产物大小/bp Size of range	多态信 息含量 PIC	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	偏离 指数 D	退火温 度/ $^{\circ}$ C T_m
OS 1	(AC) ₁₃	F: GGCTGCATCCTCTTCTTC R: TATCACTGGTGTGCGCTCC	4	179 ~ 198	0.4465	0.5161	0.4902	0.0528	56
OS 2	(AC) ₁₄	F: TCTTACCCCTCCAAAACA R: GGATGTGAGGCTTCTCTGT	5	174 ~ 213	0.6963	0.9310	0.7520	0.2380	57
OS 9	(TTTC) ₆	F: AATATGTAAACGGACAGA R: AATGCTTATGAAGAAGAT	3	362 ~ 374	0.5853	0.7188	0.6701	0.0727	52
OS 11	(GA) ₁₄ (GAAA) ₅	F: GCGTCCATGTATAATGCT R: CTAACCGCCGATCCGTCT	6	180 ~ 226	0.7116	0.4444	0.7624	-0.4171	52
OS 21	(AGAA) ₈	F: GGCACAGATAACAGTAAG R: TATGAGGCAAAAAGAAGAC	3	186 ~ 202	0.5739	0.5161	0.6600	-0.2180	52

3 讨论

本文初步探讨了微卫星标记在分析白甲鱼群体

遗传结构方面的应用。实验共获得了 5 个具有多态性的微卫星位点, 分析了各位点的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、Hardy-Weinberg 平衡偏离指

数、连锁不平衡以及无效等位基因等,为白甲鱼群体的遗传多样性分析提供了一定的信息。

遗传标记的多态性程度及其应用价值一般可用杂合度(H)、多态信息含量(PIC)来衡量。根据 Bostein 等(1980)提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标,当 $PIC > 0.5$ 时,该基因座为高度多态基因座;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态基因座;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态基因座。本实验结果显示 OS2、OS9、OS11、OS21 等 4 个位点多态信息含量 $PIC > 0.5$,为高度多态性,在白甲鱼群体遗传学研究领域中能提供确切的遗传信息。

基因杂合度表示群体在某位点杂合子的比例。Nei(1978)将其视为度量群体遗传变异的一个最合适参数,位点平均杂合度近似反映遗传结构变异程度高低,杂合度越大表明群体的遗传变异越多,群体遗传多样性越高,对环境适应能力越强。本研究中白甲鱼群体平均杂合度,即平均期望杂合度(H_e)为 0.6669,平均观测杂合度(H_o)为 0.6253,说明白甲鱼遗传多样性较高。位点 OS2 的杂合度 ≥ 0.7 ,依据 Gill(1996)提出的杂合度 ≥ 0.7 的基因座具有高鉴别力的标准,表明 OS2 的杂合度已经达到高度多态性遗传标记位点指标。

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(D)反映了 H_e 和 H_o 2 者之间的平衡关系, D 值越接近 0,基因型的分布越接近于平衡状态, D 值为正时反映杂合子过剩, D 值为负时则处于杂合子缺失状态(李鹏飞等,2006)。本研究中的 D 值 $-0.4171 \sim 0.2380$,同时出现了杂合子过剩(1 个位点)与缺失(2 个位点)现象,位点 OS11 的基因型分布偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。杂合子过剩现象一般出现在研究对象为相对小的群体或者封闭群体,如一个养殖群体里面的子代群体是由有限的亲本所产生,创造者效应(Founder effect)和瓶颈效应(Bottleneck effect)会导致连锁不平衡现象(刘云国等,2005),从而导致杂合子过剩。杂合子缺失除了与无效基因和研究样本范围大小有关外,还可能由种群退化、性别比例不均衡、亲缘近交和人为干扰程度大等导致稀有碱基的丢失所致(Antoro S et al, 2006)。本研究所用的白甲鱼样品采自于乌江彭水电站坝上坝下等 6 个不同地点,实验样本数达到了 32 尾,且 9 对引物中有 5 对引物的扩增产物都清晰稳定。由此本实验的杂合子过剩和缺失与种群本身的结构有密切的关系,可能是由于彭水电站的建立导致水文情势变化、生境破碎及阻隔、过度捕捞等干扰使其种群结构和性别比例受

到影响。

以上遗传参数表明乌江的白甲鱼群体多态性水平较高,遗传多样性丰富,但是种群结构和种质资源一定程度上受到了人类活动的影响。

志谢:感谢张轶超、杨志、朱迪、陶江平、冯瑞萍、王翔、万力、郑海涛、蔡玉鹏等为本实验采集样品。

参考文献:

- 耿波,孙效文,梁利群,等. 2006. 利用 17 个微卫星标记分析鳙鱼的遗传多样性[J]. 遗传, 28(6): 683-688.
- 韩春梅,张嘉保,高庆华,等. 2005. 微卫星 DNA 在吉戎免亲子鉴定中的应用研究[J]. 遗传, 27(6): 903-907.
- 李鹏飞,刘萍,柳学周,等. 2006. 漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析[J]. 中国水产科学, 13(1): 13-19.
- 刘云国,陈松林,李八方. 2005. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究[J]. 海洋水产研究, 26(5): 28-32.
- 屈彦纯,邓昌彦,熊远著,等. 2002. 猪 1 号染色体微卫星多态性研究及遗传连锁图谱的构建[J]. 遗传, 24(5): 539-542.
- 汤青萍,陈宽维,李慧芳,等. 2005. 应用微卫星标记对 12 个中国地方乌骨鸡品种遗传多样性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 36(8): 755-760.
- 王长忠,梁宏伟,邹桂伟,等. 2008. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传, 30(10): 1341-1348.
- 徐文迎,Thomsen H, Reinsch N, 等. 2000. 利用微卫星进行奶牛数量性状基因位点定位的研究[J]. 遗传学报, 27(9): 772-776.
- 张新宇,高燕宁. 2004. PCR 引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 4:15-18.
- Aljanabi S M & Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. Nucleic Acids Research, 25 (22): 4692-4693.
- Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. Mar Biotechnol (NY), 8(1):17-26.
- Barranikova I A. 1987. Review of sturgeon farming in the Soviet Union [J]. Journal of Ichthyology, 27(6): 62-71.
- Benson G. 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences [J]. Nucleic Acid Research, 27: 573-580.
- Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314-331.
- Gill P. 1996. A new method of STR interpretation using inferen-

- tial logic development of a criminal intelligence database [J]. *Int Leg Med*, 109:14.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual [J]. *Genetics*, 89: 583 – 590.
- Oosterhout C V, Hutchinson W F, Wills D P M, et al. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [J]. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535 – 538.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schlotterer C & Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. *Nucl Acid Res*, 20: 211 – 215.
- Weber J L. 1990. Informativeness of human (dC – dA)_n(dG – dT)_n polymorphism [J]. *Genomics*, 7: 524 – 530.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T. 1999. POPGENE Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [CP]. Edmonton: University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 11: 1 – 16.
- Zhu B, Liao X, Shao Z, et al. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 5: 888 – 892.

(责任编辑 杨春艳)

A Preliminary Analysis of Genetic Diversity of Population of *Onychostoma sima* in Wujiang River with Microsatellite Markers

XIONG Mei-hua, SHI Fang, XU Nian, QUE Yan-fu, YANG Zhong, HU Ju-xiang, ZHU Bin

(Institute of hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430079, China)

Abstract: The microsatellite markers of *Onychostoma sima* were isolated and the genetic diversity were analysed in this study. A library of partial small size fractionated genomic DNA was constructed with the *O. sima* in Wujiang river. Five polymorphic microsatellite loci were obtained. Genetic variation in a sample of 32 individuals was quantified by the number of alleles, which ranged from three to six, and PIC changed from 0.4465 to 0.7116, and by the observed and expected heterozygosities ranging from 0.4444 to 0.9310 and from 0.4902 to 0.7624 per locus, respectively, and by Hardy-Weinberg departure value (*D*) ranging from –0.4171 to 0.2380. Linkage equilibrium was not observed. The findings indicated that although the genetic diversity of *O. sima* in Wujiang river was rich, it had been influenced by the construction of Pengshui hydropower station on the Wujiang river to a certain extent.

Key words: *Onychostoma sima*; microsatellite; genetic diversity; Wujiang River