

利用微卫星标记评估乌江彭水水电站 对泉水鱼的遗传多样性影响

史方^{1,2,3}, 徐念^{1,2,3}, 熊美华², 王翔², 杨钟², 阙延福², 朱滨², 胡菊香², 常剑波²

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;

2. 水利部中国科学院水工程生态研究所, 湖北 武汉 430079; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 乌江彭水水电站建成后形成阻隔, 可能对生境连通性及坝上坝下鱼类的交流产生不利, 影响到物种遗传多样性和群体遗传结构。本研究通过磁珠富集法构建了泉水鱼 (*Pseudogyrincheilus procheilus*) 微卫星文库, 建立了泉水鱼微卫星 DNA 分子标记体系, 并利用这些微卫星分子标记初步评估了乌江彭水水电站对泉水鱼的遗传多样性影响。用 6 对具多态性的引物对乌江中 35 尾野生泉水鱼样本进行遗传多样性分析, 结果显示, 6 个位点共检测到 28 个等位基因; 每个位点平均杂合度为 0.6536, 平均多态信息含量为 0.6085, 平均 Shannon 多样性指数为 1.2752; 卡方检验得出 2 个位点显著偏离 Hardy - Weinberg 平衡, 且其中 1 个位点中出现了无效等位基因。实验初步表明乌江流域泉水鱼的遗传多样性较为丰富, 但可能受到了水电站阻隔的干扰。

关键词: 微卫星标记; 水电站; 泉水鱼; 遗传多样性

中图分类号: Q346⁺.5, X176 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 3075 (2009) 02 - 0117 - 05

随着中国经济建设的快速发展, 对能源的需求日趋旺盛。为缓解能源压力, 中国的水电的开发速度正逐步加快, 很多河流都以追求最大限度地利用水资源进行水能发电为目标。长江的干支流上因此兴建了众多的水利工程, 据统计, 截至 2005 年, 在长江干支流上, 已建各类水坝 4.8 万座, 占全国的 50%。其中大型水坝 157 座, 中型水坝 1 025 座 (贾敬德, 2005)。乌江彭水水电站坝址位于重庆市彭水县城上游 11km 的乌江干流上, 下距乌江河口涪陵 147km, 是乌江干流水电开发的第 10 个梯级。

乌江是长江上游右岸的最大支流, 流域面积广阔, 鱼类资源丰富, 是许多经济鱼类的原种基地, 作为基因遗传是其他任何水系或人工方式所不能替代的, 在乌江建造的梯级电站可能对整个流域的生态环境尤其是鱼类资源产生巨大的影响。河流被电站阻隔, 河流之间的物种基因的交流被阻断, 导致物种遗传多样性降低; 同时, 大坝的修建, 使原有连续的河流生态系统被分隔成不连续的环境单元, 造成了生境的破碎, 生境破碎化使河流定居型鱼类种群被分隔成相对孤立的、较小的异质种群 (Hanski & Gil-

pin, 1997; Cantrell et al, 2002)。当生境因破碎化而萎缩时, 其生物承载力减小, 残留种群减小, 稳定性降低, 易受偶发环境因素的影响而剧烈变动甚至于局域灭绝 (王忠锁等, 2005)。

泉水鱼 *Pseudogyrincheilus procheilus* (Sauvage et Dabry) 属鲤形目、鲤科、野鲮亚科、泉水鱼属, 俗称油鱼。它是我国特有的一种鲤科鱼类, 分布在宜昌以上长江上游干流、长江在四川境内的支流和乌江中。泉水鱼栖息于流速较大的水域的中下层, 平时喜欢生活于山溪和具流水的岩洞, 以及江河有泉源的地方, 以舔刮在江底岩石上附着的底栖生物为食 (Zhang, 1994)。泉水鱼是乌江当地重要经济鱼类之一。乌江彭水电站建成后形成阻隔, 对坝上坝下鱼类的基因交流产生不利影响, 从而可能对泉水鱼的遗传多样性和种群结构造成相应影响。因此, 为评估这种阻隔效应和生境破碎化对其作用及其强度, 有必要对成库前后的鱼类遗传多样性进行监测和评估。

目前, 微卫星标记以其多态性丰富、稳定性和可靠性倍受研究者的关注, 在水生生物的种群遗传多样性分析中得到了广泛的应用 (Heist, 2000; Reilly et al, 1999)。本研究通过建立泉水鱼微卫星 DNA 分子标记体系, 积累和完善其群体遗传多样性和遗传结构本底资料, 最终对工程阻隔可能造成的群体遗传多样性影响进行初步评估。

收稿日期: 2009 - 02 - 28

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30492034); 乌江彭水水电站水生生物监测 (PS/HB011 - 2006)。

通讯作者: 常剑波, E-mail: jbchang@mail.ihe.ac.cn

作者简介: 史方, 1983 年生, 女, 博士研究生, 主要研究方向为分子生态学, E-mail: moko@mail.ihe.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用泉水鱼由乌江干流及支流8处采样断面采样获得。各采样断面为彭水、白马、鹿角、万足、沿河、洪渡、淇滩、黑獭,其中彭水和白马位于彭水水电站坝下,其余采样断面均位于坝上(图1)。

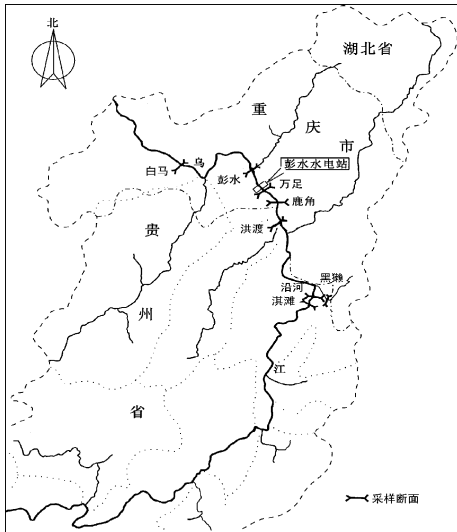


图1 乌江泉水鱼采样断面

Fig.1 Sample locations of *Pseudogyrincheilus prochilus* in Wujiang River

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 富集文库所用的泉水鱼DNA采用酚-氯仿抽提法经RNA酶消化提取(Sambrook et al, 1989);微卫星引物有效性和多态性检验所用的泉水鱼DNA采用高盐法提取(Aljanabi & Martinez, 1997)。

1.2.2 微卫星文库的构建 参见Zhu B等(2005)的方法进行,该方法在Zane等(2002)的磁珠富集法上略有一些改动。实验使用了2种鱼类常用的生物素探针进行杂交,分别是Biotin-(GATA)8和Biotin-(AAAG)7。2种探针杂交温度均为55℃,磁珠洗脱温度均为50℃。

1.2.3 微卫星序列分析和微卫星位点的获得 使用软件Tandem Repeats Finder (Benson, 1999)从得到的序列中查找出含有重复单元的微卫星序列。记录下重复次数较多并且重复区域两翼具有足够保守区的序列作为有效的微卫星位点。用在线引物设计软件Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>)设计引物,然后在Oligo 6和Premier primer 5里检测各项干扰的能值,以优化得到最合适的引物(张新宇等,2004)。设计得到的微卫星引

物由北京三博远志公司合成。合成后的引物先初步在3个泉水鱼个体中扩增以确定其最佳退火温度。

1.2.4 微卫星标记检验泉水鱼遗传多样性 使用得到的泉水鱼微卫星引物对35个泉水鱼基因组DNA模板进行PCR扩增。反应体系如下:模板DNA 1 μL (20 ng/μL),正反向引物各1 μL (10 pmol/μL),0.1 μL Taq酶(5 U/μL,东盛),1 μL 10 × PCR buffer(东盛),0.6 μL Mg²⁺ (25 μmol/μL,东盛),0.6 μL dNTPs(2.5 μmol/μL,东盛),用灭菌双蒸水补足至10 μL。扩增程序为94℃预变性5 min;94℃变性40 s,引物最佳退火温度复性40 s,72℃延伸50 s,35个循环;最终72℃延伸10 min。每次PCR反应均设不含模板DNA的空白对照。扩增产物经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙锭染色,之后在凝胶成像系统(Syngene)中扫描。通过软件Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad)分析电泳图,判定等位基因大小和数量。在PopGene 1.32 (Yeh et al, 1999)中计算等位基因频率、Nei遗传杂合度(Nei, 1973)、Shannon多样性指数(Shannon&Weaver, 1949)和进行Hardy-Weinberg平衡的卡方检验并计算Hardy-Weinberg遗传偏离指数(王长忠等, 2008)。之后,利用得到的等位基因频率在PIC_CALC 0.6 (中国水产科学研究院黄海水产研究所种质资源与工程育种室)中计算多态信息含量。

2 结果

2.1 生物素探针杂交结果及阳性克隆情况

本实验使用的2种鱼类常用的生物素探针Biotin-(GATA)8和Biotin-(AAAG)7均为四碱基重复探针。其中Biotin-(GATA)8探针杂交后测序获得1个含微卫星序列,阳性克隆率仅为5%;而Biotin-(AAAG)7探针杂交后测序阳性克隆率则达到了58.7%。

2.2 获得的微卫星序列情况

本实验共获得16条完全不同的微卫星序列。其中6条缺乏足够的上游侧翼或者下游测序序列、不能用于引物设计,能设计出微卫星引物的序列为10条。

根据Weber(1990)提出的标准,微卫星序列总体上可分为3类:完美型(perfect),非完美型(imperfect)和混合型(compound)。此次16条微卫星序列中为完美型13个、非完美型1个、混合型2个,所占的百分比分别为81.25%、6.25%和12.50%。其中完美型和非完美型的微卫星序列均为四碱基重复;

混合型微卫星序列 1 条为四碱基重复,另 1 条为四碱基重复和二碱基重复混合。

2.3 泉水鱼野生群体遗传多样性水平检验

在 35 个野生泉水鱼个体中的扩增情况表明,10 对微卫星引物中有 6 对具多态性,1 对呈单态,其余 3 对无扩增产物或无法稳定扩增。具多态性的 6 个微卫星分子标记的等位基因数、多态信息含量和遗

传杂合度等统计结果分别见表 1。

Hardy – Weinberg 平衡卡方检验值表明,有 2 个微卫星位点 (SP – 3 和 SP – 14) 显著偏离 Hardy – Weinberg 平衡 ($P < 0.05$)。利用软件 Micro – Checker 2.2.3 (Oosterhout et al, 2004) 对这 2 个位点进行检验,发现位点 SP – 14 在 95% 的置信区间内有无效等位基因出现的迹象。

表 1 6 个微卫星标记在 35 个乌江泉水鱼个体中的特征

Tab.1 Characteristics of six microsatellite markers from *Pseudogyrincheilus prochilus* in 35 individuals from Wujiang River

微卫星标记 Microsatellite markers	退火温 度/℃ Tm	核心序列 Repeat motif	等位基因 数/个 No. of alleles	产物大 小/bp Size range	多态信 息含量 PIC	遗传杂 合度 H	Shannon 多样 性指数 I	Hardy – Weinberg 平衡卡方 检验值 P	Hardy – Weinberg 遗传偏离 指数 D
SP – 3	64.0	(TTTC) ₁₂	6	216 ~ 284	0.7835	0.8110	1.7161	0.0106	0.0764
SP – 4	58.0	(AAGA) ₆	2	210 ~ 226	0.2437	0.2841	0.4581	0.2440	0.1898
SP – 6	62.0	(GAAT) ₁₂	3	231 ~ 255	0.5908	0.6649	1.0959	0.2404	0.1014
SP – 14	54.0	(AAAG) ₁₀	5	171 ~ 211	0.6524	0.6988	1.3712	0.0000	-0.6584
SP – 16	54.0	(AGAA) ₁₂	8	136 ~ 196	0.7896	0.8118	1.8427	0.1481	0.0754
SP – 19	60.0	(AGAA) ₉	4	185 ~ 209	0.5912	0.6510	1.1668	0.0000	-0.0916

3 讨论

3.1 泉水鱼微卫星文库的构建

微卫星文库的构建是获得微卫星分子标记的关键。磁珠富集法分离微卫星分子标记是一种简单高效的方法,在一些植物和动物微卫星分子标记的分离方面已得到广泛应用(邓欣等,2008 ;全迎春等,2006)。由于微卫星探针的使用,目的微卫星也有很强的针对性,获得的微卫星序列一般较长。本实验中测序获得的 16 个微卫星位点,重复次数在 10 以上的有 11 个(68.75%),最高重复次数为 19 次,且所有位点均为四碱基重复,这与所使用的四碱基生物素探针的微卫星针对性相符。较高重复数的微卫星序列的获得,有利于开发更多多态性微卫星分子标记。

本实验中 2 种探针杂交得出的结果差异很大,这可能是由于探针杂交和磁珠洗脱温度较低、非特异性结合较多的原因。

3.2 微卫星分子标记的筛选

Bostein 等 (1980) 首先提出的多态信息含量 (PIC) 是衡量微卫星分子标记多态性的良好指标。当 $PIC > 0.5$ 时,该座位为高度多态性位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态性座位; $PIC < 0.25$ 时,为低度多态性位点。本实验所得到的 6 个微卫星位点的等位基因数为 2 ~ 8 个,平均为 4.7 个;PIC 值在 0.2437 ~ 0.7896,平均为 0.6085。此结果表明有 5

个位点为高度多态性位点,表现出较为丰富的信息含量,尤其是引物 SP – 3 和 SP – 16 标记。这些具有高多态性的位点在进一步的群体遗传结构和多样性分析中有很好的应用价值。

3.3 泉水鱼的遗传多样性水平评估

群体遗传多样性水平是评价生物资源的重要指标,其值的高低与种群适应生存能力大小密切相关。遗传杂合度 (H) 又称基因多样性,反映各群体在 n 个位点上的遗传变异,它与等位基因数量、多态信息含量等均为衡量群体内的遗传多样性的通用指标 (Nei et al, 1975)。同时,Shannon 多样性指数也是衡量群体遗传多样性高低的一个有用参数 (Shannon&Weaver, 1949)。这些指标的高低反应了群体的遗传一致性程度:值越高,表明该群体的遗传一致度越低,遗传多样性越高。本实验中 6 个微卫星标记在 35 个个体的野生泉水鱼群体中共检测到 28 个等位基因,平均 4.7 个,处于较高的水平;6 个位点平均杂合度 H 为 0.6536,平均多态信息含量为 0.6085,平均 Shannon 多样性指数 1.2752,这说明该群体遗传多样性水平较高。Hardy – Weinberg 遗传偏离指数 (D) 反映了观测杂合度和期望杂合度两者之间的平衡关系,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。本研究中卡方检验得出 2 个位点显著偏离 Hardy – Weinberg 平衡,且其中 1 个位点 (SP – 14) 中出现了无效等位基因,

该位点的 Hardy – Weinberg 遗传偏离指数(D)值也显示出杂合子严重缺失的现象。这种情况可能由多种原因导致,比如样本范围大小、种群退化、亲缘近交和人工选择等;对于泉水鱼,这可能是彭水水电站的工程阻隔造成种群基因流被阻断、种群结构和性别比例受到影响所致,建议开展建设过鱼设施等恢复鱼类坝上坝下通道的相关研究。

志谢:张轶超、郑海涛、杨志、陶江平、朱迪、冯瑞萍、万力、蔡玉鹏等对本实验样品采集给予无私帮助!

参考文献:

- 邓欣,陈信波,龙松华,等. 2008. 用磁珠富集法分离亚麻基因组微卫星分子标记[J]. 作物学报, 34(12): 2 099 – 2 105.
- 贾敬德. 2005. 长江水资源开发的冷思考[J]. 淡水渔业, 35(2): 62 – 64.
- 全迎春,孙效文,刘伟,等. 2006. 磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记[J]. 水产学报, 30(2): 185 – 190.
- 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): 1 341 – 1 348.
- 王忠锁,吕偲,许崇任,等. 2005. 江湖阻隔对短吻间银鱼空间发生格局的影响[J]. 生物多样性, 13(5): 407 – 415.
- 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): 4 692 – 4 693.
- 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.
- Cantrell R S, Cosner C, Fagan W F. 2002. Habitat edges and predator – prey interactions: effects on critical patch size [J]. Mathematical Biosciences, 175(1): 31 – 55.
- Hanski I, Gilpin M E. 1997. Metapopulation theory[M]. Metapopulation Biology: 63 – 67.
- Heist E J. 2000. DNA microsatellit loci and genetic structure of red snapper in the Gulf of Mexico[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 129(2): 469 – 475.
- Nei M. 1973. Analysis of gene divevsity in subdivided populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 70: 3 321 – 3 323.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations[J]. Evolution, 29: 1 – 10.
- 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.
- Reilly A, Elliott N G, Grewe P M, et al. 1999. Genetic differentiation between tasmanian cultured Atlantic salmon(*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: Comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation[J]. Aquaculture, 173: 459 – 469.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual :2nd[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shannon C E, Weaver W. 1949. The mathematical theory of communication[M]. Urbana: University of Illinois Press.
- Weber J L. 1990. Informativeness of human (dC – dA)n (dG – dT)n polymorphisms[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 microsatel – lite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 11: 1 – 16.
- Zhang E. 1994. Phylogenetic relationships of the endemic Chinese cyprinid fish *Pseudogyrincheilus procheilus* [J]. Zoological Research, 15: 26 – 35.
- 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 张俊友)

Using Microsatellite Markers to Assess the Impacts by Pengshui Hydropower Station on Wujiang River on Population Genetic Diversity in *Pseudogyrincheilus procheilus*

SHI Fang^{1,2,3}, XU Nian^{1,2,3}, XIONG Mei-hua², WANG Xiang², YANG Zhong²,
QUE Yan-fu², ZHU Bin², HU Ju-xiang², CHANG Jian-bo²

- (1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430079, China;
3. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Fragmentation of the Wujiang river ecosystem caused by Pengshui hydropower station may disrupt the connectivity of ecosystem and communication of fish populations, consequently, fish population genetic structure and diversity will be affected. In this study, we established a partial genomic library for *Pseudogyrincheilus procheilus*. 6 microsatellite markers were assessed genetic diversity for 35 individuals. The results show that the total numbers of alleles in 6 loci was twenty – eight. The average heterozygosity (H), average polymorphism information content (PIC) and average Shannon's Information index (I) were 0.6536, 0.6085 and 1.2752, respectively. Two loci showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, and one of them had evidence for null alleles. The findings indicated that although the genetic diversity of *P. procheilus* in Wujiang river was rich, it may had been influenced by Pengshui hydropower station to a certain extent.

Key words: microsatellite markers, hydropower station, *Pseudogyrincheilus procheilus*, genetic diversity