

三峡库区长鳍吻鮡种群遗传多样性的初步研究

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

(1. 水利部中国科学院水工程生态研究所, 湖北 武汉 430079;

2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:用磁珠富集法构建了长鳍吻鮡(AAAG)n富集文库,从中分离并鉴定得到13个微卫星位点。对三峡库区重庆江段的40尾长鳍吻鮡群体进行了遗传多样性的初步研究,其中6个位点呈现多态性(1个位点为中度多态,5个位点为高度多态),等位基因数目为4~11个,观测杂合度在0.20~0.85。这些多态性位点将为长鳍吻鮡及其近缘种的种群遗传研究提供有力的遗传学资料。

关键词:微卫星;长鳍吻鮡;三峡库区;种群遗传;多态性位点

中图分类号:Q346+.5,X176 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)02-0113-04

长鳍吻鮡(*Rhinogobio ventralis* Sauvage et Dabry),地方名土耗儿,隶属鲤科、鮡亚科、吻鮡属,是长江中上游特有鱼类,主要分布于上江上游干、支流(伍献文等,1997),是长江上游干流和乌江下游渔获物中的重要组成部分,肉质鲜美,具有较高的经济价值。长鳍吻鮡生活在河流底层,以底栖动物为食,适应流水生活,在急流中产漂流性卵(周启贵等,1992)。

长江上游渔获物主要由适应于较急水流条件的种类组成,1990年代以来,各种大型水利工程的建立,改变了江河原有的生态环境,在不同程度上影响了鱼类的生长与繁殖,加之捕捞强度不断增加,水域污染日渐加剧,长江上游主要的经济鱼类种类和数量均显著减少,其中产漂流性卵的河道洄游性种类如铜鱼、长鳍吻鮡等大幅减产,在渔获物中所占比例下降(陈大庆等,2002)。刘军(2004)运用濒危系数、遗传损失系数和物种价值系数对长江上游16种特有鱼类的优先保护顺序进行了定量分析,圆口铜鱼、长鳍吻鮡等被列为低危鱼类,岩原鲤、圆口铜鱼、长鳍吻鮡等9种特有鱼类达到三级急切保护标准。

三峡库区位于长江上游下段重庆市东部和湖北省西部之间,有着丰富的鱼类资源。三峡大坝建成后,库区形成1 150 km²的水面,除航道外,仍有近700 km²水面,首尾落差120 m,河流水面加宽,流速

变缓,水径流量减少,洪峰减弱,水质变清,污染物沉积增强,自净能力减弱(幸莫权等,2006)。库区干支流有鱼类140种,其中上游特有种47种,经济鱼类30余种。建库后,由于上游环境的改变,约40种鱼类受到不利影响,其中2/5为上游特有鱼类,因栖息地面积缩小约1/4,种群数量相应减少(中国科学院环境评价部和长江水资源保护科学研究所,1996)。与1970年代资料相比,库区主要经济鱼类捕捞规格明显下降,渔获物中小型化、低龄化现象较为严重,库区鱼类资源已呈衰退趋势,生态环境的变迁和过度捕捞等因素是造成这种现象的主要原因(段辛斌等,2002)。为了更有效地保护和合理利用鱼类资源,在遗传学水平上利用分子标记对生物种群进行认识和分析起着极为重要的作用。

微卫星DNA(microsatellite DNA),又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR),是一类广泛随机分布于基因组中的串联重复DNA。微卫星核心序列一般为以1~6 bp核苷酸为单位的重复序列,侧翼序列大多是保守的单拷贝序列。微卫星位点多位于基因非编码区域或基因内含子中,具有多态性丰富、杂合度高、重组率低和共显性遗传等特点,已被广泛应用于群体遗传结构分析、遗传图谱的构建、亲子鉴定和分子标记辅助育种等方面的研究(朱滨等,1999)。鲁双庆等(2005)应用微卫星分子标记对鲫4个群体的遗传结构及亲缘关系进行了分析,结果显示4个鲫群体的遗传多样性总体水平较高,白鲫和红鲫亲缘关系较近。Palti等(2002)利用微卫星标记与有害等位基因的连锁,对罗非鱼近交系中所产生的有害等位基因给予了鉴定和消除。Liao X L等(2006;2007)等用FIASCO法分离出9

收稿日期:2009-02-28

基金项目:国家自然科学基金重大项目(30490234);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:徐念,女,1984年生,硕士研究生。E-mail: xunian@mail.ihe.ac.cn

个铜鱼的多态性微卫星位点和 20 个圆口铜鱼的多态性微卫星位点。

目前关于吻鮰属的微卫星位点还没有相关报道。本研究通过建立长鳍吻鮰微卫星富集文库,从中分离得到 6 对具有多态性的微卫星位点。该位点将为长鳍吻鮰及其近缘物种的种群遗传结构分析和遗传多样性研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 长鳍吻鮰

8 尾长鳍吻鮰采自长江上游水系不同江段,40 尾采自重庆朝天门江段。均取鳍条保存于无水乙醇中。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用于构建基因组文库的 DNA 提取自 8 尾采自长江上游水系不同江段的长鳍吻鮰个体,其鳍条混合剪碎后采用酚-氯仿抽提法,经 RNA 酶消化。用于引物检验和筛选的群体为采自长江重庆朝天门江段的 40 尾长鳍吻鮰群体,采用高盐法提取每个个体的 DNA (Aljanabi, 1997)。

1.2.2 微卫星富集文库的构建及阳性克隆的筛选 利用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences containing repeats) 法 (Zane et al, 2002) 经过部分修改 (Zhu B et al, 2005) 后的方案建立 (AAAG)_n 富集文库。将含有插入片段且大小合适 (200 ~ 800bp) 的阳性克隆送出测序。

1.2.3 序列分析及引物设计 用 TANDEM REPEATS FINDER version 4.0 (Benson, 1999) 在测序结果中查找重复序列。针对所得到微卫星的侧翼序列,用 PRIMER PREMIER 5.0 (张新宇等, 2004) 设计引物。

1.2.4 引物检验及微卫星位点筛选 每对引物预先在 3 尾长鳍吻鮰个体中检验并优化 PCR 反应条件。得到有效扩增产物的引物在 40 尾长鳍吻鮰个体中依照优化的反应条件进行扩增。10 μL PCR 反应体系包括: 10 mM Tris - HCl, 50 mM KCl, 0.5 U Taq DNA 聚合酶 (东盛生物科技), 2 μM 引物对, 1.5 mM MgCl₂ 和 每种 dNTP (Biomed) 0.2 mM。PCR 反应在 T - Gradient AmpCycler (Biometra) 中进行。反应条件如下: 94 ℃ 预变性 5 min; 35 个循环包括: 94 ℃ 变性 40 s, 50 ~ 64 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 50 s; 72 ℃ 最后延伸 10 min。扩增产物在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳检测。电泳产物用 Bioered (Biotium) 染色并在紫外凝胶成像系统 (Syn-gene) 中拍照。等位基因大小用软件 QUANTITY ONE 4.6.2 估计, 观测和期望杂合度在软件 POP-GEN 1.32 中计算。多态信息含量 (polymorphism information conten, PIC) 用软件 PIC - CALC 0.6 计算。

2 结果与分析

2.1 测序结果及引物设计

得到 86 个阳性克隆测序结果, 其中 34 个包含微卫星序列。根据这些序列利用软件设计并挑选出 15 对引物。

2.2 引物检测及微卫星位点筛选

在检测的 15 对引物中, 13 对能在长鳍吻鮰个体中产生有效的目的条带。这 13 对引物在 40 尾长鳍吻鮰个体中进行扩增, 其中 6 个位点呈现出多态性, 各含有 4 ~ 11 个等位基因, 并呈现出较高的期望杂合度 (表 1)。6 个微卫星位点中, 除 RV - 15 为中度多态 (0.25 < PIC < 0.5) 外, 其它 5 个位点均显示出高度多态性 (PIC > 0.5) (Botstein et al, 1980)。

表 1 长鳍吻鮰微卫星位点特征

Tab.1 Characteristics of microsatellite loci in Rhinogobio ventralis

位点	重复单元	引物序列	片段大小/ bp	退火温度 Ta /℃	等位基因 数 N _a /个	观测杂合 度 H _o	期望杂 合度 H _e	多态信息 含量 PIC
RV - 01	(CT) ₁₇	F: AAGGTTACTCCCTCCC R: CTTACCCACAGTTCATT	108 - 132	58	7	0.75	0.81	0.77
RV - 07	(AAAG) ₁₈	F: TGAAGGAAGCAAAACA R: GTCTGAGTGACGAGGC	197 - 233	56	7	0.85	0.80	0.76
RV - 09	(CTTT) ₂ CCCTT T(CTTT) ₅	F: GAGTTACAGCCACAGG R: GTCTGCAAATGAGCAA	105 - 145	62	11	0.73	0.79	0.75
RV - 12	(TTCT) ₁₁	F: CCAATCATTCCGGATA R: GGAAAGGAGGAAGGTAA	202 - 242	50	7	0.78	0.82	0.78
RV - 13	(TTTC) ₁₈ TCTT T(CT) ₁₃	F: CCTTTCCATTTCCGTTGA R: TGACCTGCCCTCCACT	156 - 216	64	8	0.60	0.82	0.78
RV - 15	(TTTC) ₁₁	F: CAGTAAACGGAGATAGGA R: TCAGGGTCAGCATCAA	207 - 231	62	4	0.20	0.56	0.46

3 讨论

微卫星在所有测序结果中所占比例为 39.5%,显示插入序列包含了大量非目的片段,可能与磁珠在杂交和洗脱时的温度控制有关,适当地提高温度有助于增加针对目的微卫星序列的特异性。2 对引物没有扩增出条带或者扩增产物模糊,可能是引物设计时没有设计出合适的引物对。13 对成功扩增的微卫星位点中,多态性位点占 46.2%,有 7 个位点仅扩增得到 1 条目的条带或者在所有个体中都得到 2 条相同的条带,这些位点在这 40 个长鳍吻鲈个体的群体中呈现单态性。杂合度和多态信息含量分别是评价群体遗传多样性和衡量微卫星位点变异程度高低的重要指标。CHENG F 等(2007)用鲤科鱼类微卫星引物在鲢中进行扩增,筛选得到了 11 对具有较高多态性的微卫星位点,等位基因数在 2~7 个,进而利用这些位点进行了群体遗传多样性初步分析,结果显示:鲢野生群体的平均等位基因数为 5.2 个;观测杂合度在 0.25~0.8,平均观测杂合度是 0.61,平均期望杂合度是 0.8,群体座位平均多态信息含量为 0.72;相比之下,养殖群体的平均观测杂合度和平均期望杂合度都低于野生群体。本研究结果显示,平均等位基因数为 7.3,平均观测杂合度为 0.65,平均期望杂合度为 0.77,平均多态信息含量为 0.72。本研究所得到的多态性微卫星位点呈现出较高的多态性,将用于长鳍吻鲈及其近缘种的种群遗传结构和遗传多样性分析,进而对物种保护和鱼类资源合理开发利用起到重要作用。

微卫星作为新型的遗传标记技术,为鱼类遗传学研究提供了有力工具。由于微卫星 DNA 的孟德尔遗传特性及共显性的特征,因而可以根据多个微卫星位点在不同群体中出现的等位基因频率计算杂合度、遗传距离等,从而描述群体的遗传结构和确定种群的遗传变异(郭宝英等,2007)。遗传多样性研究已日益成为自然科学研究的热点之一,物种保护的根源就是保护遗传多样性,微卫星 DNA 标记技术已成为检测物种遗传多样性的一个重要手段,这对种质资源的评估、分子标记辅助育种等方面都具有重要意义。

大型水利工程的建设对鱼类资源产生了重大影响。大坝阻隔了原有连续的河流生态系统,造成生境破碎化,使得鱼类种群被分割成小群体,导致基因交流障碍和遗传分化,从而使种群遗传多样性的维持能力降低。长江上游干流葛洲坝和三峡大坝以及

乌江下游彭水水电站的建设,都使得这 2 个江段长鳍吻鲈的群体发生分割。评估坝体上下种群遗传分化、破碎种群间基因交流程度等对鱼类资源的保护有着重要意义,而分子生物学研究无疑是最有力的手段。利用多态性微卫星位点进行群体遗传分析,将为上述研究提供丰富的遗传学数据。大坝蓄水改变了库区江段原有的河流自然生态环境,对鱼类生活环境产生了重大影响,尤其对于像长鳍吻鲈一样适应流水生活、产漂流性卵的鱼类;水库淹没导致的水域生境层次简化,使流水性鱼类的关键生境消失,水体流速变缓,使鱼类在上游所产的卵没有足够的距离进行漂流发育,增加它们的早期死亡率(常剑波等,2006)。利用微卫星标记技术,通过物种群体遗传结构和多样性分析、分子遗传图谱的构建等研究,能够对鱼类种质资源进行有效的保护。

参考文献:

- 常剑波,陈永柏,高勇,等. 2006. 水利水电工程对鱼类的影响及减缓对策[M]//国家环境保护总局环境影响评价管理司. 水利水电开发项目生态环境保护研究与实践. 北京:中国环境科学出版社:239-253.
- 陈大庆,段辛斌,刘绍平,等. 2002. 长江渔业资源变动和管理对策[J]. 水生生物学报,26(6):685-690.
- 段辛斌,陈大庆,刘绍平,等. 2002. 长江三峡库区鱼类资源现状的研究[J]. 水生生物学报,26(6):605-611.
- 郭宝英,谢从新,熊冬梅. 2007. 微卫星 DNA 标记技术及其在鱼类中的应用[J]. 水利渔业,27(4):5-9.
- 刘军. 2004. 长江上游特有鱼类受威胁及优先保护顺序的定量分析[J]. 中国环境科学,24(4):395-399.
- 鲁双庆,刘臻,刘红玉,等. 2005. 鲫鱼 4 群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析[J]. 中国水产科学,12(4):371-377.
- 伍献文,罗云林,乐佩琦,等. 1997. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海:上海人民出版社.
- 幸莫权,李建勇. 2006. 三峡库区的渔业资源及保护[J]. 生物学通报,41(12):20-22.
- 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,2(4):15-18.
- 中国科学院环境评价部,长江水资源保护科学研究所. 1996. 长江三峡水利枢纽环境影响报告书[M]. 北京:科学出版社.
- 周启贵,何学福. 1992. 长鳍吻鲈生物学的初步研究[J]. 淡水渔业,(5):11-14.
- 朱滨,常剑波. 1999. 微卫星 DNA 及其在鱼类中的应用[J]. 水生生物学报,23(6):721-728.
- Aljanabi S, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extracted of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research,25:4 692-4 693.

- Benson G. 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences [J]. *Nucleic Acid Research*, 27: 573 ~ 580.
- Botstein 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.
- Cheng F, Ye V, Ye F L. 2007. Isolation Of microsatellite DNA and preliminary genomic analysis of mud Carp (*Cirrhina mofitorella*) [J]. *Zoological Research*, 28(2): 119 ~ 125.
- Liao X, Zhu B, Yu X, et al. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, grass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 6: 393 ~ 395.
- Liao X, Yu X, Chang J, et al. 2007. Polymorphic microsatellites in largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) developed from repeat-enriched libraries and cross-species amplifications [J]. *Molecular Ecology Notes*, 7: 104 ~ 107.
- Palti Y, Shirak A, Cnaani A, et al. 2002. Detection of genes with deleterious alleles in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. *Aquaculture*, 206: 151 ~ 164.
- 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 张俊友)

Preliminary Studies on Genetic Diversity of *Rhinogobio ventralis* in Three Gorges Reservoir

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

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

Abstract: From a (AAAG)_n enriched genomic library, we developed 13 microsatellites loci from *Rhinogobio ventralis*, using the fast isolation by AFLP of sequences containing repeats (FIASCO) protocol. In a test on a population of 40 individuals from Three Gorges Reservoir, Six primer pairs exhibited polymorphic with 4 to 11 alleles per locus. Observed heterozygosities ranged from 0.20 to 0.85. These loci should provide sufficient level of genetic diversity to evaluate the fine-scale population structure in the population of *Rhinogobio ventralis* and its congeneric species.

Key words: microsatellites; *Rhinogobio ventralis*; Three Gorges Reservoir; polymorphic loci; population genetics