

# 基于微卫星标记的拟鲤遗传多样性 及群体遗传结构分析

李可<sup>1</sup> 马徐发<sup>1</sup> 谢鹏<sup>1</sup> 高萌<sup>1</sup> 郭焱<sup>2</sup> 谢从新<sup>1</sup> 侯杰<sup>1</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 新疆维吾尔自治区水产科学研究所, 乌鲁木齐 830000

**摘要** 利用 16 对多态性微卫星标记对新疆额尔齐斯河干流北湾河段、支流哈巴河以及乌伦古湖拟鲤(*Rutilus rutilus*) 3 个地理群体的遗传多样性及遗传结构进行了分析。结果显示, 16 个微卫星位点的平均多态信息含量 PIC、期望杂合度  $H_e$  和等位基因数 AN 分别为 0.902 9、0.916 8 和 18.937 5, 遗传参数均反映出 3 个群体较高的遗传多样性水平。乌伦古湖群体的遗传多样性水平略低于哈巴河和北湾群体。主成分分析表明, 影响乌伦古湖群体与哈巴河和北湾群体间遗传多样性差异的主要因素可能为盐度。遗传分化指数和 UPGMA 聚类分析显示 3 个群体间均未发生种群遗传分化。分子变异分析(AMOVA)显示个体间的变异贡献率为 88.47%, 仅少部分变异来源于群体间(1.83%), 表明拟鲤 3 个群体间的遗传变异水平较低。

**关键词** 拟鲤; 微卫星标记; 遗传多样性; 种群遗传结构

**中图分类号** Q 959.46<sup>+</sup>8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0112-09

拟鲤(*Rutilus rutilus*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、拟鲤属(*Rutilus*), 在北欧各水域分布广泛, 在我国原仅分布在新疆额尔齐斯河水域, 是中国境内额尔齐斯河水域 23 种土著鱼类之一<sup>[1]</sup>。在 20 世纪 50 年代, 额尔齐斯河干流渔获物的主要组成物种为拟鲤和白斑狗鱼(*Esox lucius*), 20 世纪 80 年代后, 外来入侵种欧鳊(*Abramis brama*)逐渐成为绝对优势种, 渔获物占比高达 80%, 而土著鱼类仅占 15% 左右<sup>[2-3]</sup>。额尔齐斯河水域近几十年来受加剧的渔业捕捞、引种移植、工农业生活污水排入等因素的影响, 其水生态环境发生变化, 土著鱼类资源遭到了严重的破坏, 优势种更替明显, 拟鲤作为土著渔业资源之一也呈现衰退趋势<sup>[3]</sup>。而在额尔齐斯河附属水系的乌伦古湖, 拟鲤的生长也呈现出一定的受阻趋势<sup>[4]</sup>。

种内遗传多样性是影响种群长期生存能力的最主要因素之一, 也是种群进化的基础<sup>[5]</sup>。而遗传多样性受遗传漂变、基因突变等内因和环境变化、商业开发等外因的影响, 群体间基因流动受到限制。如果仅考虑商业价值, 过度开发而忽略生物资源内在的遗传多样性及其保护, 物种的遗传系统稳定性将遭到破坏<sup>[6]</sup>。因此, 科学合理地开发利用鱼类资源

对于濒危鱼类的遗传多样性保护、经济鱼类的可持续发展十分重要。近些年, 关于拟鲤的报道中较多关注生理生化、体内寄生虫分布等方面的研究<sup>[7-10]</sup>, 年龄、生长等普通生物学方面也有所涉及<sup>[4, 11]</sup>, 但其遗传背景方面的知识了解甚少。随着分子生物学的快速发展, 各类分子标记技术应运而生, 微卫星分子标记以其稳定性、高效性而被广泛应用于遗传图谱构建、遗传多样性、指纹鉴定、遗传结构分析等研究中。此外, 拟鲤线粒体 DNA 核苷酸序列已完成测序和组装<sup>[12]</sup>, 转录组相关数据也已发表<sup>[13]</sup>, 为本研究查找分子标记及设计引物提供了数据支持。因此, 本研究筛选了 16 对多态性微卫星标记, 结合采样点的水质数据分析拟鲤 3 个群体的遗传多样性水平及遗传差异, 探讨其与环境因子的相关性, 以期为该物种的资源利用、合理保护及分子标记辅助育种等提供可靠的理论依据, 同时对于额尔齐斯河及乌伦古湖水生生态环境的保护和促进新疆渔业经济可持续发展具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

2016 年 8 月在乌伦古湖(UL, N47.03 E87.23)

收稿日期: 2018-02-22

基金项目: 国家科技基础性工作专项(2012FY112700)

李可, 硕士研究生, 研究方向: 渔业资源与环境. E-mail: 386949585@qq.com

通信作者: 侯杰, 博士, 讲师. 研究方向: 渔业环境生物调控. E-mail: shengwuhj@qq.com

采集拟鲤样本 40 尾,2013 年 7 月在新疆额尔齐斯河干流北湾河段(BW,N48.02 E85.55)和支流哈巴河(HBH,N48.18 E86.42)采集拟鲤样本共计 100 尾,采集网具为定置刺网(网目 5 cm)和流刺网(内层网目 11 cm,外层网目 23 cm),部分样本从当地渔民处购买。每个样本测量体长、体质量等基础生物学数据后剪取新鲜尾鳍条,于 95%乙醇中 4℃保存备用。

1.2 总 DNA 的提取

取 0.05~0.1 g 尾鳍条,采用改进的醋酸铵提取法提取 DNA<sup>[14]</sup>。待提取的 DNA 自然干燥后加入去离子水溶解,并将质量浓度稀释到 100 ng/μL,用微量紫外分光光度计(ND2000,美国 nanodrop 公司)检测 DNA 质量和浓度后于-20℃保存备用。

1.3 微卫星引物设计及筛选

基于 NCBI 数据库中已发表的转录组数据<sup>[13]</sup>,使用 MISA 软件进行微卫星序列筛选<sup>[15]</sup>,按如下标准筛选:不考虑单碱基重复;微卫星序列最小长度为 12 bp;二碱基重复次数在 6 次或 6 次以上;三碱基及四碱基重复在 5 次或 5 次以上;五碱基及六碱基重复次数在 4 次或 4 次以上。用 Primer5.0 设计微

卫星引物<sup>[16]</sup>,将设计好的引物序列送至武汉擎科伟业生物科技有限公司合成。

本研究使用温度梯度 PCR 仪以 2℃作为一个温度梯度对 96 对微卫星引物和哈巴河 24 个个体 DNA 进行总体系为 20 μL 的 PCR 扩增<sup>[17]</sup>。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测并在凝胶成像系统(GDS-8000,美国 UVP 公司)中观察分析,检测目的条带及最适退火温度,选择条带较亮、杂带较少且稳定扩增出目的条带的退火温度作为最适退火温度。

1.4 微卫星标记多态性检测

将筛选得到的稳定扩增出目的条带的引物经 QIAxcel (Qiagen,Leipzig,Germany)毛细管电泳初步检测多态性<sup>[18]</sup>,筛选出呈现多态性的引物,将其用于拟鲤 3 个群体遗传多样性分析,同样经 QIAxcel 毛细管电泳检测记录峰值、确定其基因型并保存结果。

1.5 水质数据获取方法

参考文献<sup>[19]</sup>及相关国家标准采集、测定水样,使用水质分析仪 Potable Water Quality Analyzer (g a portable Alalis MP3500,Alalis,中国,上海)现场测定水质参数值。

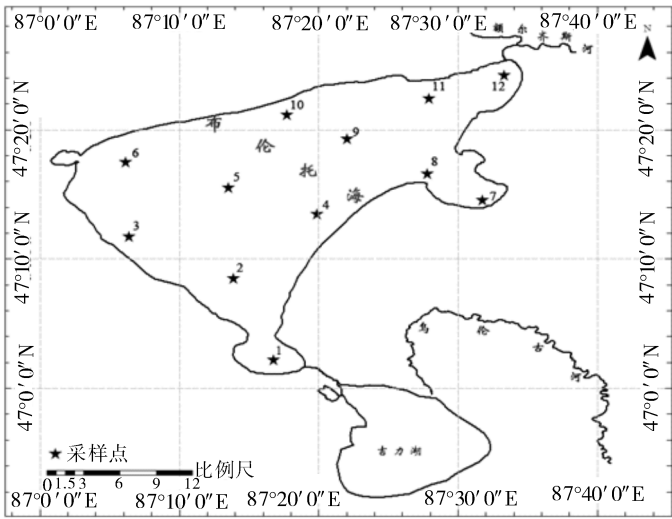


图 1 乌伦古湖水水质采样位点设置

Fig.1 Sampling sites for abiotic environmental features in the Ulungur Lake

额尔齐斯河干流北湾河段、支流哈巴河水质数据自 2013 年 7 月至 2016 年 7 月每个季度测定 1 次。在乌伦古湖湖心区、主要进出水口、沿岸区等处设置 12 个采样点(图 1),2016 年 7 月、10 月和 2017 年 2 月、5 月春夏秋冬 4 个季度每个样点各测定一次,取 12 个样点水质参数平均值。

1.6 群体遗传多样性和遗传结构分析

经筛选保留的多态性微卫星引物用于拟鲤 3 个地理群体样本 DNA 的 PCR 扩增,扩增产物经毛细管电泳分型以计算群体遗传参数。用 POPGENE (Version 1.31)<sup>[20]</sup>统计分析以下指标:等位基因数 AN、主要等位基因频率MAF、观测杂合度H、期

望杂合度  $H_e$ 、遗传分化指数  $F_{st}$ 、Nei's 遗传距离  $D^{[21]}$ 、多态信息含量 PIC、Hardy-Weinberg 平衡,并分析各基因座间连锁不平衡现象。多态信息含量 PIC 利用 PIC\_CALC(version 0.6)软件计算。使用 ARLEQUIN(version 3.11)软件进行分子变异分析(AMOVA),计算各变异来源的贡献度并衡量种群遗传变异水平<sup>[22]</sup>。基于 Nei 氏遗传距离,利用 MEGA(Version 6.05)软件构建 3 个拟鲤群体的系统树图(UPGMA 法)<sup>[23]</sup>。相关性分析及主成分分析分别使用 R(version 3.3.3)和 Origin(Version 94E)软件进行。

表 1 拟鲤 16 个多态性微卫星位点的相关信息

| Table 1 Characteristics of the 16 polymorphic microsatellite loci isolated from <i>R. rutilus</i> |                                                     |                          |                         |                                    |                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 位点<br>Locus                                                                                       | 引物序列 (5'-3')<br>Primer sequences (5'-3')            | GenBank 号<br>GenBank No. | 重复类型<br>Repeat<br>motif | 退火温度/℃<br>Annealing<br>temperature | 产物/bp<br>Product<br>size |
| H45                                                                                               | R:TAAATGGACTCCGGTTGGCC<br>F:TCTCGGTCTCGGGGAGATTT    | MF372687                 | (GAG) <sub>7</sub>      | 48                                 | 241~271                  |
| H71                                                                                               | R:AGCACCTTGGAACTACGGTG<br>F:ACACAAATGGAGGTCTGGGA    | MF372692                 | (TCGT) <sub>5</sub>     | 44                                 | 222~262                  |
| H64                                                                                               | R:CATCCGCCAACCCTTAATG<br>F:TCAGCAAGGACAGGTTCAGT     | MF372690                 | (TA) <sub>10</sub>      | 44                                 | 234~296                  |
| H80                                                                                               | R:GCAGCTCTCTTTCCTCAGCA<br>F:GCAGTGGCACATCCCTTTTC    | MF372693                 | (AG) <sub>10</sub>      | 44                                 | 267~321                  |
| H38                                                                                               | R:GGGGCAGCTTTACTTTCCCA<br>F:TGAGTGTGTTTTGCTCTGGGT   | MF372685                 | (TAT) <sub>7</sub>      | 56                                 | 240~279                  |
| H92                                                                                               | R:GAGAAGCAAACAGGCCGAA<br>F:AGGAATGCACGGTGTGTCT      | MF372697                 | (GT) <sub>10</sub>      | 56                                 | 107~145                  |
| H20                                                                                               | R:ATGTCCACTACGGCAAGAGC<br>F:AACTCATCCCGATCCAGA      | MF372684                 | (TTGC) <sub>6</sub>     | 56                                 | 256~300                  |
| H91                                                                                               | R:GGAGAGAAACTGAGGCCGAG<br>F:AGTGGGAACGCAGAGTGAAG    | MF372696                 | (TC) <sub>10</sub>      | 56                                 | 137~169                  |
| H44                                                                                               | R:ATGGCAACTGGGAGAATGCT<br>F:TCTGTGGCTGCAAAAAGGA     | MF372686                 | (TAC) <sub>7</sub>      | 56                                 | 235~260                  |
| H55                                                                                               | R:GGTATTTTGATGGATTGGGCGG<br>F:TGTCTGCCTTTCGAAAGTGC  | MF372689                 | (GC) <sub>10</sub>      | 56                                 | 92~118                   |
| H94                                                                                               | R:TCAATACGGCGGCTGACTTT<br>F:AGAGAGAGACAGCGTGGACT    | MF372698                 | (GA) <sub>10</sub>      | 56                                 | 208~236                  |
| H96                                                                                               | R:ACGAGGGCGAATGTGAACTT<br>F:ACTGCATGACGTCACATCGT    | MF372699                 | (GT) <sub>10</sub>      | 56                                 | 268~314                  |
| H54                                                                                               | R:CTCTCCTTTCTCTCACGGCC<br>F:TGTGCTGTTTCTCTGTGTGCT   | MF372688                 | (GA) <sub>10</sub>      | 56                                 | 195~233                  |
| H65                                                                                               | R:AAAACAGCCTTCGGATTTCGC<br>F:ACTCGCTCTTTCTGATGGG    | MF372691                 | (CATC) <sub>5</sub>     | 56                                 | 279~323                  |
| H86                                                                                               | R:TCAACATGTAAAGTAGCCTTGTC<br>F:CCAAGCTAATCAGTGAGCGC | MF372694                 | (CT) <sub>10</sub>      | 56                                 | 252~292                  |
| H89                                                                                               | R:CACCCAAGCTGATCAAACGC<br>F:CACCCGAAGAGTTCGTTGT     | MF372695                 | (AT) <sub>10</sub>      | 56                                 | 270~318                  |

条带,存在不同程度的扩增失败。多态性的检测通过 QIAxcel 毛细管电泳得到的峰值图来判断。本研究共获得稳定目的条带的引物有 63 对,其中 30

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星引物设计及多态性引物的筛选

基于已发表的转录组数据(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>登录号:SRR1776878),从微卫星分布来看,单碱基重复到六碱基重复类型均有出现,单碱基重复数量最多,随后依次为二碱基重复、三碱基重复和四碱基重复,五碱基重复和六碱基重复数量很少。利用 primer5.0 进行引物设计,挑选 96 对引物合成。以哈巴河 24 个个体基因组 DNA 为模板,96 对引物经 PCR 扩增,有 33 对未扩增出目的

对具有多态性,16 对呈现出高多态性,多态性微卫星引物占据有效扩增引物的比例为 47.6%。高多态性的 16 对引物基本信息见表 1,相关引物序列已上

传至 GenBank 数据库。

2.2 拟鲤群体遗传多样性分析

本试验利用经筛选得到的 16 个多态性微卫星标记对拟鲤 3 个地理群体总样本的多态信息含量 PIC、期望杂合度  $H_e$ 、等位基因数 AN、主要等位基因频率 MAF、观测杂合度  $H_o$  以及 Hardy-Weinberg 平衡 HWE 进行了统计分析(表 2)。

结果显示, 16 个位点的等位基因数范围为 12~34, 平均为 18.94, 观测杂合度和期望杂合度范围分别为 0.571 4~0.972 2 和 0.860 4~0.959 4, 平均为 0.823 0 和 0.916 8, 多态信息含量范围为 0.839 4~0.950 5, 平均为 0.902 9。位点 H80 多态性最高, 位点 H20 多态性最低, 遗传多样性参数均表明额尔齐斯河水系拟鲤群体遗传多样性丰富。在

Bonferroni 校正后检测等位基因型是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡(标准  $P=0.003$ ), 结果显示其中 4 个位点(H71、H64、H38 和 H96)显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡(表 2)。16 个微卫星位点均未发现连锁不平衡。

将剩余 12 个多态性位点用于群体遗传多样性分析, 哈巴河、乌伦古湖、北湾群体的多态信息含量分别为 0.88、0.87 和 0.88。比较而言, 乌伦古湖拟鲤群体的多态信息含量相对较低, 结合 3 个采样点的水质数据(表 3)做了主成分分析(图 2), 结果表明电导率(COND)、总溶解固体(TDS)和盐度(SAT)可能是影响乌伦古湖群体与哈巴河、北湾群体之间遗传差异的主要因素。12 个位点在 3 个群体中均表现出高效性, 其遗传多样性指标见表 4。

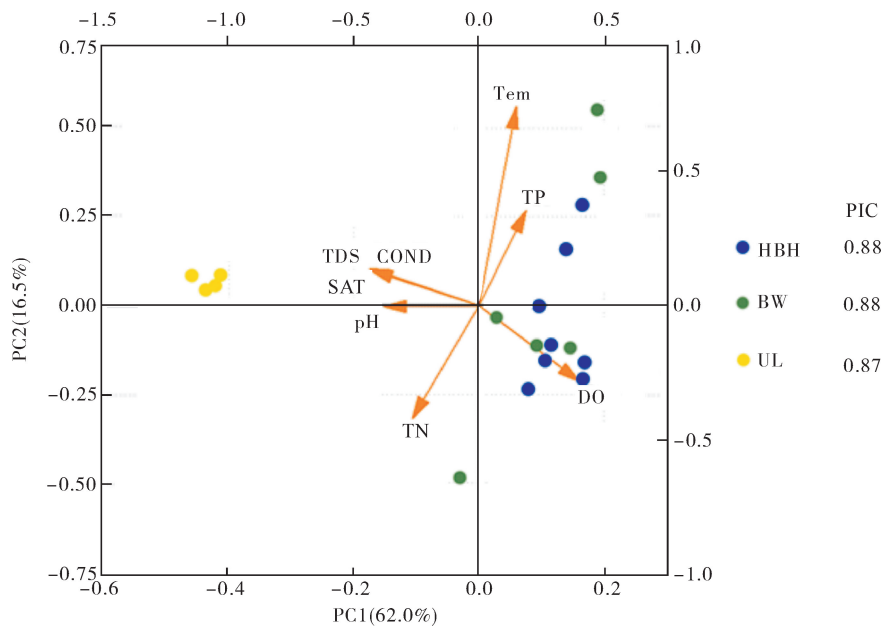
表 2 拟鲤 16 个微卫星位点的多态性信息  
Table 2 Characteristics of the 16 polymorphic microsatellite loci in the *R. rutilus* specimens from the three populations (Xinjiang, China)

| 位点<br>Locus | 样本量<br>Sampling size | MAF     | AN       | $H_e$   | $H_o$   | PIC     | HWE      |
|-------------|----------------------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| H45         | 70                   | 0.142 9 | 13       | 0.898 0 | 0.857 1 | 0.881 5 | 0.262 8  |
| H71         | 72                   | 0.215 3 | 13       | 0.875 5 | 0.819 4 | 0.856 0 | 0.000 0* |
| H64         | 68                   | 0.102 9 | 28       | 0.950 7 | 0.808 8 | 0.940 9 | 0.000 2* |
| H80         | 70                   | 0.114 3 | 34       | 0.959 4 | 0.757 1 | 0.950 5 | 0.008 6  |
| H38         | 69                   | 0.123 2 | 23       | 0.935 6 | 0.579 7 | 0.924 3 | 0.000 8* |
| H92         | 71                   | 0.218 3 | 17       | 0.887 1 | 0.873 2 | 0.869 8 | 0.630 3  |
| H20         | 70                   | 0.264 3 | 13       | 0.860 4 | 0.571 4 | 0.839 4 | 0.165 1  |
| H91         | 67                   | 0.171 6 | 16       | 0.907 9 | 0.910 4 | 0.893 0 | 0.174 5  |
| H44         | 65                   | 0.107 7 | 22       | 0.944 1 | 0.876 9 | 0.933 2 | 0.594 1  |
| H55         | 65                   | 0.215 4 | 14       | 0.882 8 | 0.938 5 | 0.863 8 | 0.073 5  |
| H94         | 70                   | 0.142 9 | 15       | 0.921 4 | 0.814 3 | 0.908 5 | 0.011 3  |
| H96         | 72                   | 0.097 2 | 23       | 0.949 1 | 0.875 0 | 0.939 5 | 0.000 0* |
| H54         | 72                   | 0.166 7 | 17       | 0.921 1 | 0.875 0 | 0.908 6 | 0.055 8  |
| H65         | 72                   | 0.159 7 | 12       | 0.890 7 | 0.777 8 | 0.873 2 | 0.085 3  |
| H86         | 72                   | 0.138 9 | 19       | 0.931 4 | 0.972 2 | 0.920 0 | 0.007 0  |
| H89         | 72                   | 0.083 3 | 24       | 0.952 8 | 0.861 1 | 0.943 5 | 0.008 0  |
| 平均值 Mean    | 69.812 5             | 0.154 0 | 18.937 5 | 0.916 8 | 0.823 0 | 0.902 9 | —        |

注：\* 表示在 Bonferroni 校正后显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。Note: \* Locus showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, after Bonferroni correction.

表 3 3 个采样点的水质参数信息  
Table 3 Some indicators of water quality data of the three sampling sites

| 采样点<br>Sampling site | 温度/℃<br>Tem. | pH   | 溶氧量/<br>(mg/L)<br>DO | 盐度/<br>(g/L)<br>SAT | 总溶解固体/<br>(g/L)<br>TDS | 电导率/<br>(mS/cm)<br>COND | 总氮/<br>(mg/L)<br>TN | 总磷/<br>(mg/L)<br>TP |
|----------------------|--------------|------|----------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
| 哈巴河 HBH              | 12.49        | 7.58 | 11.73                | 0.04                | 0.06                   | 0.09                    | 0.50                | 0.06                |
| 北湾 BW                | 13.76        | 7.67 | 10.92                | 0.07                | 0.10                   | 0.14                    | 0.64                | 0.08                |
| 乌伦古湖 UL              | 10.30        | 8.84 | 7.99                 | 2.07                | 1.89                   | 3.34                    | 1.06                | 0.03                |



箭头代表原始变量,其中方向代表相关性,长度代表贡献度。The arrows imply primitive variables, of which the directions represent correlation and the length represented contribution to the principal component.

图 2 影响遗传多样性主要环境因子的主成分分析

Fig.2 PCA plot of environmental factors and PIC of the three populations

表 4 拟鲤 3 个群体的遗传多样性参数信息

Table 4 Details of diversity parameters for the three groups of *R. rutilus*

| 位点<br>Locus | 哈巴河 HBH |      |    |       |       |      | 乌伦古湖 UL |      |       |       |       |      | 北湾 BW |      |    |       |       |      |
|-------------|---------|------|----|-------|-------|------|---------|------|-------|-------|-------|------|-------|------|----|-------|-------|------|
|             | SS      | MAF  | AN | $H_e$ | $H_o$ | PIC  | SS      | MAF  | AN    | $H_e$ | $H_o$ | PIC  | SS    | MAF  | AN | $H_e$ | $H_o$ | PIC  |
| H45         | 24      | 0.17 | 10 | 0.90  | 1.00  | 0.87 | 23      | 0.17 | 11    | 0.89  | 0.78  | 0.86 | 23    | 0.15 | 11 | 0.91  | 0.78  | 0.88 |
| H80         | 24      | 0.21 | 19 | 0.92  | 0.83  | 0.90 | 23      | 0.13 | 11    | 0.91  | 0.70  | 0.88 | 23    | 0.13 | 16 | 0.93  | 0.78  | 0.91 |
| H92         | 24      | 0.29 | 11 | 0.87  | 0.88  | 0.84 | 24      | 0.15 | 11    | 0.91  | 0.88  | 0.88 | 23    | 0.24 | 12 | 0.88  | 0.87  | 0.85 |
| H20         | 24      | 0.23 | 9  | 0.86  | 0.79  | 0.82 | 24      | 0.27 | 9     | 0.85  | 0.42  | 0.82 | 22    | 0.30 | 12 | 0.87  | 0.50  | 0.84 |
| H91         | 23      | 0.13 | 13 | 0.92  | 0.96  | 0.89 | 23      | 0.24 | 11    | 0.87  | 0.87  | 0.84 | 21    | 0.14 | 14 | 0.93  | 0.90  | 0.90 |
| H44         | 21      | 0.19 | 12 | 0.90  | 0.90  | 0.87 | 22      | 0.14 | 14    | 0.93  | 0.86  | 0.90 | 22    | 0.23 | 8  | 0.87  | 0.86  | 0.83 |
| H55         | 21      | 0.17 | 11 | 0.90  | 0.95  | 0.86 | 22      | 0.30 | 11    | 0.84  | 0.86  | 0.80 | 22    | 0.20 | 12 | 0.90  | 1.00  | 0.86 |
| H94         | 24      | 0.17 | 14 | 0.92  | 0.83  | 0.89 | 24      | 0.19 | 13    | 0.91  | 0.83  | 0.88 | 22    | 0.16 | 12 | 0.91  | 0.77  | 0.88 |
| H54         | 24      | 0.23 | 13 | 0.90  | 0.92  | 0.87 | 24      | 0.15 | 13    | 0.93  | 0.92  | 0.90 | 24    | 0.15 | 16 | 0.94  | 0.79  | 0.91 |
| H65         | 24      | 0.17 | 11 | 0.91  | 0.79  | 0.88 | 24      | 0.19 | 10    | 0.89  | 0.83  | 0.86 | 24    | 0.25 | 9  | 0.87  | 0.71  | 0.83 |
| H86         | 24      | 0.15 | 15 | 0.93  | 1.00  | 0.90 | 24      | 0.15 | 14    | 0.93  | 1.00  | 0.90 | 24    | 0.13 | 15 | 0.94  | 0.92  | 0.91 |
| H89         | 24      | 0.13 | 18 | 0.95  | 0.83  | 0.92 | 24      | 0.15 | 20    | 0.95  | 0.83  | 0.92 | 24    | 0.13 | 19 | 0.94  | 0.92  | 0.92 |
| 平均值<br>Mean | 23.42   | 0.18 | 13 | 0.91  | 0.89  | 0.88 | 23.42   | 0.18 | 12.33 | 0.90  | 0.82  | 0.87 | 22.83 | 0.18 | 13 | 0.91  | 0.82  | 0.88 |

2.3 群体间遗传分化

拟鲤 3 个群体间 Nei 氏遗传距离  $D$  及遗传分化指数  $F_{st}$  见表 5。从表 5 可以看出乌伦古湖和哈巴河群体间遗传距离最大( $D=0.385\ 1$ ),哈巴河和北湾群体间遗传距离相对较小( $D=0.282\ 2$ )。Wright<sup>[24]</sup>建立的  $F$ -统计方法( $F$ -statistics)用遗传分化指数  $F_{st}$  描述种群间遗传变异以及分化程度,3

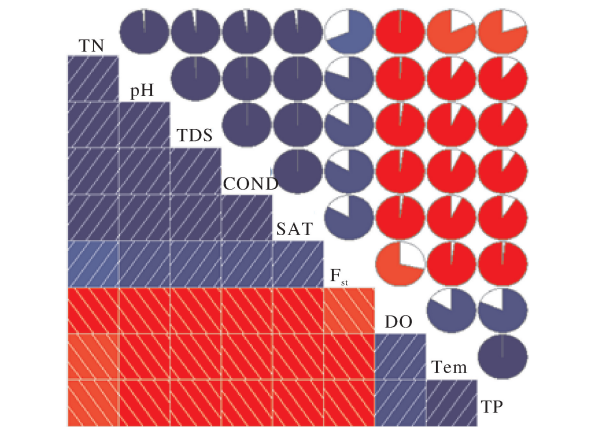
个群体间  $F_{st}$  的值均小于 0.05,说明 3 个群体间均未发生种群遗传分化,3 个群体属于同一个种群。相关性分析表明(图 3),SAT、COND、TDS 和 pH 均与  $F_{st}$  呈正相关关系,DO、TP 和温度则与  $F_{st}$  呈负相关关系。基于 Nei 氏遗传距离的 UPGMA 聚类分析显示(图 4),哈巴河和北湾群体聚为一支,乌伦古湖群体独立为一支,3 个群体最终形成了一簇。



表 5 拟鲤 3 个群体间的遗传分化指数(对角线上)及遗传距离(对角线下)

Table 5 Pairwise  $F_{st}$  (on the diagonal) and genetic distance values (under the diagonal) among the three groups of *R. rutilus*

| 采样点<br>Sampling site | 哈巴河<br>HBH | 乌伦古湖<br>UL | 北湾<br>BW |
|----------------------|------------|------------|----------|
| HBH                  | 0          | 0.026 8    | 0.012 0  |
| UL                   | 0.385 1    | 0          | 0.022 3  |
| BW                   | 0.282 2    | 0.310 0    | 0        |



红色代表负相关,蓝色代表正相关,颜色和填充面积的饱和度代表相关性的 大小。Blue indicates positive correlations while red indicates negative. The size and gradation of the color area represent the significance of correlation.

图 3 3 个群体间遗传分化与环境因子的相关性分析  
Fig.3 Correlation analyzing of the  $F_{st}$  and water quality data among the three populations

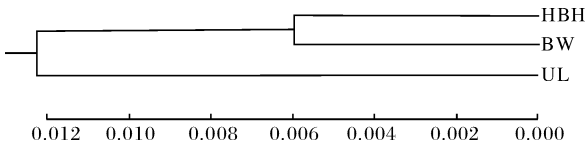


图 4 拟鲤 3 个群体的 UPGMA 聚类分析  
Fig.4 Phylogenetic dendrogram of the three groups of *R. rutilus* based on the Nei's genetic distance by the UPGMA cluster  
AMOVA 分析显示(表 6),个体间的变异贡献率达到 88.47%,仅少部分变异来源于群体间(1.83%),不同群体间均未出现种群遗传分化,表明拟鲤 3 个地理群体间的遗传变异水平较低。

3 讨 论

3.1 微卫星分布特点及多态性引物筛选

在真核生物基因组中,排除单碱基重复类型,多数物种的微卫星重复类型都是以二碱基重复为主<sup>[25]</sup>。除单碱基重复类型,本研究转录组序列中得到的二碱基重复类型的微卫星数量也为最多,且二

表 6 分子方差分析(AMOVA)  
Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA)

| 变异来源<br>Source of variation                    | 平方和<br>Sum of squares | 方差组分<br>Variance components | 变异比例/%<br>Percentage of variation |
|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 群体间<br>Among populations                       | 21.056                | 0.099                       | 1.83                              |
| 群体内个体间<br>Among individuals within populations | 400.167               | 0.521                       | 9.70                              |
| 个体间<br>Within individuals                      | 342.500               | 4.757                       | 88.47                             |
| 总变异<br>Total                                   | 763.723               | 5.377                       | 100.00                            |

碱基重复微卫星标记的筛选效率及多态性高于三、四碱基重复,这也与房祖业等<sup>[26]</sup>的结果相一致。蔡磊等<sup>[27]</sup>提出,在微卫星分子标记研究中,尽量选取重复次数较高的微卫星标记,更有可能检测出较为丰富的多态性和较高的杂合度。本研究挑选的微卫星标记中二碱基重复次数 $\geq 10$ 次、三碱基重复次数 $\geq 7$ 次、四碱基重复次数 $\geq 5$ 次,以便提升微卫星开发效率。

导致本研究转录组微卫星引物 34.4%的扩增失败率的原因可能是引物存在与非目的位点错配、测序错误以及引物设计的质量等。有研究<sup>[28]</sup>表明,由于同聚物序列链的划移、前端和后端读取错误等原因,Illumina 和 NGS 等测序平台难免发生测序错误。另外一个重要的原因是由于转录组序列中引物结合区可能包含内含子。微卫星位点在编码区和非编码区均有分布<sup>[29]</sup>,若引物结合区包含内含子,会导致引物扩增失败。

3.2 群体遗传多样性分析

遗传多样性是评估种群资源状况的重要依据,与该物种的生存能力、适应能力和进化潜能密切相关<sup>[30]</sup>。多态信息含量 PIC、观测杂合度  $H_o$ 、等位基因数 AN、期望杂合度  $H_e$  等都是反映群体遗传多样性及遗传变异的主要参数,这些遗传参数的数值与遗传多样性、基因丰富度呈正相关<sup>[31]</sup>。PIC 反映了微卫星位点所提供的遗传信息容量,当 PIC 大于 0.5 时,表示该位点为高度多态性位点<sup>[32]</sup>。微卫星标记筛选结果表明,本研究筛选得到的 16 个微卫星标记均为高多态性位点。位点 H38 的  $H_o$  和  $H_e$  差异较大,可能是该位点上的无效等位基因(null allele)所导致的<sup>[33]</sup>。若无效等位基因不被识别,在 PCR 扩增时会导致纯合子过剩或杂合子缺失,从而导致  $H_o$  和  $H_e$  出现偏差。群体 PIC、 $H_o$  和  $H_e$  等遗传学参数表明,我国额尔齐斯河水系 3 个群体的

拟鲤种群受环境影响相对较小、遗传多样性水平高、遗传变异丰富。主成分分析结果显示,水体盐度可能是影响乌伦古湖群体同额尔齐斯河群体 2 个群体间遗传多样性差异的主要因素。水体温度及盐度影响遗传多样性或遗传变异的研究对于一些水生植物、水生动物较为常见<sup>[34-35]</sup>。盐度是影响鱼类生长的重要环境影响因素之一,Naddafi 等<sup>[36]</sup>研究了伊朗北部不同盐度水体环境中拟鲤种群的生长特性,结果发现低盐度水体中的拟鲤生长较优。乌伦古湖蒸发量较大,只有进水口无出水口,特别是近年来,出水量的锐减直接导致水位上升,湖区盐度持续上升<sup>[4]</sup>。而拟鲤起源于淡水<sup>[8]</sup>,生境的转换可能导致生存和竞争压力提升,群体中部分个体以及携带的遗传信息遭到淘汰的机率增大,因而遗传多样性水平随之降低,这一点也有待于进一步的工作证实。

### 3.3 种群遗传分化

微卫星 DNA 遵循孟德尔遗传定律,具有共显性特征,因此,可以根据微卫星位点在不同群体间或个体间表现出的遗传差异进行种间鉴别及亲缘关系鉴定<sup>[37]</sup>。UPGMA 聚类分析和遗传分化指数表明,拟鲤 3 个地理群体间未出现明显分化,各群体间的遗传变异不明显,可作为区域性地理种群对待,地理上的距离对拟鲤 3 个群体遗传多样性影响较小。分析 3 个拟鲤群体的来源可知,起初,在中国拟鲤仅分布于额尔齐斯河水域,直至 1966 年被人工引种到乌伦古湖,后随着“引额济海”引水渠竣工,随渠道大量流入并成为乌伦古湖重要的经济鱼类之一<sup>[38]</sup>。因此,各群体间生境是连续的,时间及空间间隔不大,各群体间存在一定的基因交流,故我国境内拟鲤群体未出现明显的遗传分化。此外,哈巴河与北湾同处额尔齐斯河连续且相对更近的水体中,拟鲤的溯游能力以及产漂流性卵保证了两个群体间的基因交流,因而遗传距离相对更近。

盐度是水环境的主要参数之一,水体盐度的变化会对生物体的生理机能造成严重影响。刘彩霞<sup>[39]</sup>对鲚属(*Coilia*)鱼类进行系统学研究,结果显示凤鲚(*Coilia mystus*)和九龙江鲚(*C. jiu-longjiangensis*)种群遗传分化显著,导致鲚属物种分化的可能原因是不同地域的鲚属祖先所受的水温及盐度差异。电导率(COND)的大小主要取决于水体所含离子浓度,盐度(SAT)反映水中所含溶解的盐类物质的量,水体矿化度(TDS)反映水中所含无机矿化物成分的总量,三者均是水体含盐量指标,因

此 COND、TDS 和 SAT 在同一水域存在一定的正相关关系。乌伦古湖 TDS 平均质量浓度达到 1.89 g/L,根据 TDS 大小可将水体划分为中度咸水(3~10 g/L)、稍咸水(1~3 g/L)和淡水(小于 1 g/L)等,结合水质数据可知,乌伦古湖为稍咸水水体。乌伦古湖盐度平均值为 2.07 g/L,与 TDS 表现出相似的含量规律。相比较而言,乌伦古湖拟鲤群体同哈巴河、北湾群体之间的遗传距离相对较大,其主要原因可能是乌伦古湖的含盐量指标较高,而哈巴河与北湾之间所在的干流属于拟鲤相对更适应的淡水水体。

### 3.4 微卫星标记在渔业资源监测和保护中的应用

鲤科鱼类种类繁多,是我国淡水养殖鱼类的主力,在渔业生产中占据重要地位。近年来我国水产科学研究者已筛选出红鳍原鲂(*Cultrichthys erythropterus*)<sup>[40]</sup>、厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)<sup>[41]</sup>、东北雅罗鱼(*L. waleckii*)<sup>[42]</sup>等鲤科鱼类的微卫星标记,拟鲤“种”级水平微卫星标记的遗传多样性及种群遗传结构分析尚不清楚。Zhigileva 等<sup>[43]</sup>采用同工酶标记方法对鄂毕河—额尔齐斯河水域拟鲤与另 2 种鲤科鱼类的群体遗传结构进行了比较分析,而微卫星标记手段对拟鲤群体遗传结构的研究还比较欠缺,这与其作为我国区段额尔齐斯河水域重要土著经济鱼类的地位是不相称的。

微卫星标记能够区分不同群体间的亲缘关系远近及其遗传差异,为跨区域引种奠定基础。本研究利用微卫星标记对拟鲤 3 个地理群体进行了遗传多样性和群体遗传结构分析,结果表明我国额尔齐斯河水系拟鲤遗传多样性丰富、多态性水平高,显示了当前额尔齐斯河水域及乌伦古湖拟鲤群体遗传现状,不但丰富了拟鲤微卫星序列数据库,而且可以为进一步开展拟鲤种群的种质鉴定、遗传变异分析、遗传育种和亲缘物种的遗传多样性评估等提供理论依据,也将为构建遗传连锁图谱最终实现分子标记辅助育种提供便捷之路。

## 参 考 文 献

- [1] 任慕莲,郭焱,张人铭,等.我国额尔齐斯河的鱼类及鱼类区系组成[J].干旱区研究,2002,19(2):62-66.
- [2] 郭焱,张人铭,李红.额尔齐斯河土著鱼类资源衰退原因与保护措施[J].干旱区研究,2003,20(2):152-155.
- [3] 阿达可白克·可尔江.额尔齐斯河中国段鱼类资源现状及合理开发[J].水利渔业,2005,25(1):48-50.

- [4] 李鸿.新疆乌伦古湖拟鲤的年龄、生长与繁殖[D].武汉:华中农业大学,2009.
- [5] SCHINDLER D E, HILBORN R, CHASCO B, et al. Population diversity and the portfolio effect in an exploited species[J]. Nature, 2010, 465(7298): 609-612.
- [6] ALTUKHOV Y P. Genetic processes in populations[J]. Russ J Genet, 2003, 39(10): 1214-1217.
- [7] SOBECKA E, PIASECKI W. Parasite fauna of selected fish species of Lake Miedwie[J]. Wiad Parazytol, 2002, 48(2): 207-215.
- [8] RÜCKERT S, KLIMPEL S, PALM H W. Parasite fauna of bream *Abramis brama* and roach *Rutilus rutilus* from a man-made waterway and a freshwater habitat in northern Germany[J]. Dis Aquat Organ, 2007, 74(3): 225-233.
- [9] PRONIN N M, BATUEVA M D, SONDUEVA L D, et al. Changes in the numbers of dominating parasites as indicators of the condition of roach, *Rutilus rutilus lacustris*, and dace *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Pisces: Cyprinidae) populations in the transect Selenga River â River Delta â Lake Baikal[J]. Aquat Ecosyst Health, 2010, 13(1): 35-40.
- [10] 王新, 焦丽, 汪博良, 等. 额尔齐斯河湖拟鲤寄生虫季节动态及其优势虫种的寄生情况调查研究[J]. 新疆农业大学学报, 2012, 35(1): 38-41.
- [11] KANAYA G, YADRENKINA E N, ZUYKOVA E I, et al. Contribution of organic matter sources to cyprinid fishes in the Chany Lake-Kargat River estuary, western Siberia[J]. Mar Freshwater Res, 2009, 60(6): 510-518.
- [12] ERMAKOV O A, LEVINA M A, TITOV S V, et al. mtDNA-based identification of two widespread roach species (*Rutilus*, Cyprinidae) characterized by sympatric zone[J]. Inland Water Biol, 2017, 10(1): 112-114.
- [13] CHI W, MA X, NIU J, et al. Characterizing the transcriptome and molecular markers information for roach, *Rutilus rutilus* [J]. J Genet, 2016, 95(1): 45-51.
- [14] 彭敏, 陈秀荔, 蒋伟明, 等. 醋酸铵法提取卵形鲳鲹基因组 DNA [J]. 天津农业科学, 2011, 17(1): 114-117.
- [15] ZHENG X, CHENG P, YING D, et al. Development of micro-satellite markers by transcriptome sequencing in two species of *Amorphophallus* (Araceae) [J]. BMC genomics, 2013, 14(1): 490-500.
- [16] 任亮, 朱宝芹, 张轶博, 等. 利用软件 primer premier 5.0 进行 PCR 引物设计的研究[J]. 辽宁医学院学报, 2004, 25(6): 43-46.
- [17] 雷杜娟. 额尔齐斯河贝加尔雅罗鱼微卫星标记筛选及其遗传多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [18] DEAN D A, WADL P A, HADZIABDIC D, et al. Analyzing microsatellites using the QIAxcel system[J]. Methods Mol Biol, 2013: 223-243.
- [19] 张觉民, 何志辉. 内陆水域渔业自然资源调查手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1991.
- [20] YEH F C, YANG R C, BOYLE T, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[D]. Edmonton; University of Alberta, 1997.
- [21] YEH F C, YANG R, BOYLE T. POPGENE Version 1.32 microsoft windows-based freeware for populations genetic analysis[D]. Edmonton; University of Alberta, 1999.
- [22] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinform, 2005, 1(4A): 47-50.
- [23] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations[M]. Chicago; University of Chicago Press, 1968.
- [25] MA Z Q, RÖDER M, SORRELLS M E. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat[J]. Genome, 1996, 39(1): 123-130.
- [26] 房祖业, 陈晓东, 吴咏诗, 等. 大刺鲃二、三、四碱基重复微卫星标记的筛选和特征分析[J]. 海洋与湖沼, 2018(1): 174-182.
- [27] 蔡磊, 陈小曲, 郑伟强, 等. 诸氏鲃虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 57-62.
- [28] ROBASKY K, LEWIS N E, CHURCH G M. The role of replicates for error mitigation in next-generation sequencing [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(1): 56-62.
- [29] LAWSON M J, ZHANG L. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes[J]. Genome Biol, 2006, 7(2): 14.
- [30] ZHOU L X, XIAO Y, XIA W, et al. Analysis of genetic diversity and population structure of oil palm (*Elaeis guineensis*) from China and Malaysia based on species-specific simple sequence repeat markers [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 16247-16254.
- [31] WAPLES R S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci[J]. Conserv Genet, 2006, 7(2): 167-184.
- [32] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [33] 陈微, 张全启, 于海洋, 等. 牙鲈微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 682-687.
- [34] 陈琳琳. 几种双壳贝类 ITS 区序列分析与遗传多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [35] 杨巧莉. 中国鲈属鱼类进化关系及刀鲈、凤鲈的分子系统地理学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [36] NADDAFI R, ABDOLI A. Age, growth and reproduction of the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) in the Anzali and Gomishan wetlands, North Iran[J]. J Appl Ichthyol, 2005, 21(6): 492-497.
- [37] 于悦, 庞美霞, 俞小牧, 等. 利用微卫星分子标记分析长江、赣江和鄱阳湖鲢群体遗传结构[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(6): 104-110.
- [38] 左昌培, 姜正炎, 李胜忠. 布伦托海湖拟鲤的生物学研究[J]. 淡



水渔业,2001,31(2):53-57.

[39] 刘彩霞.长臀鮠属与鲃属的物种有效性分析及系统学研究[D]. 武汉:中科院水生生物研究所,2007.

[40] 王春艳.微卫星和 EST 标记在两种鲤科鱼类遗传分析中的应用 [D].武汉:中科院水生生物研究所,2006.

[41] WANG J, YU X M, ZHAO K. Microsatellite development for an endangered bream *Megalobrama pellegrini* (Teleostei, Cyprinidae) using 454 sequencing[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13 (3):3009-3021.

[42] 刘金亮,常玉梅,徐丽华,等.东北雅罗鱼微卫星分子标记的筛选及特征分析[J].华北农学报,2011,26(1):87-93.

[43] ZHIGILEVA O N, OZHIREL'E V V V, BROL' I S, et al. Populational structure of three fish species (Cypriniformes: Cyprinidae) living in rivers of the Ob-Irtysh basin, by the data of isoenzyme analysis[J]. J Appl Ichthyol, 2010, 50(9): 778-787.

**Genetic diversity and population genetic structure of *Rutilus rutilus* based on microsatellite genetic markers**

LI Ke<sup>1</sup> MA Xufa<sup>1</sup> XIE Peng<sup>1</sup> GAO Meng<sup>1</sup> GUO Yan<sup>2</sup> XIE Congxin<sup>1</sup> HOU Jie<sup>1</sup>

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;  
2. Fisheries Science Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

**Abstract** Sixteen microsatellite markers were used to analyze the genetic diversity and population structure of *Rutilus rutilus* from the Beiwan section of the main stream, Habahe River and Ulungur Lake in the Irtysh River basin. The expected heterozygosity, average number of alleles and polymorphism information content were 0.916 8, 18.937 5 and 0.902 9, respectively, suggesting higher level of genetic diversity. The genetic diversity of fish in Ulungur Lake was relatively lower than that in Irtysh River. The principal component analysis showed that salinity might be the major factor for genetic diversity between Ulungur Lake and the other two sampling sites.  $F_{st}$  and UPGMA cluster showed that the three populations were almost non-differentiated. AMOVA analysis revealed a high genetic variation within individuals (88.47%), while the genetic variation among populations was low (1.83%), indicating lower variation levels among the three populations.

**Keywords** *Rutilus rutilus*; microsatellite marker; genetic diversity; population genetic structure

(责任编辑:边书京)