

飘鱼微卫星位点的筛选及珠江流域5个地理群体的遗传多样性分析

阮惠婷 徐姗楠 李敏 戴嘉格 李振海 邹柯姝 刘丽

MICROSATELLITE PRIMERS SCREENING AND GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF FIVE GEOGRAPHICAL POPULATIONS OF *PSEUDOLAUBUCA SINENSIS* IN THE PEARL RIVER BASIN

RUAN Hui-Ting, XU Shan-Nan, LI Min, DAI Jia-Ge, LI Zhen-Hai, ZOU Ke-Shu, LIU Li

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.061>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

西昌华吸鳅的微卫星引物筛选及赤水河四个地理种群的遗传多样性分析

ISOLATION OF MICROSATELLITE LOCI AND GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF *SINOASTROMYZON SICHANGENSIS*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1224–1230 <https://doi.org/10.7541/2019.145>

华南鲤选育群体不同世代遗传多样性与遗传结构的微卫星分析

GENETIC DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE ANALYSIS OF DIFFERENT SELECTIVE BREEDING GENERATIONS IN *CYPRINUS CARPIO RUBROFUSCUS* USING MICROSATELLITE MARKERS

水生生物学报. 2018, 42(5): 887–895 <https://doi.org/10.7541/2018.109>

青鱼野生与养殖群体遗传变异的微卫星分析

MICROSATELLITE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION OF WILD AND CULTURAL POPULATIONS IN BLACK CARP *MYLOPHARYNGODON PICEUS*

水生生物学报. 2019, 43(5): 939–944 <https://doi.org/10.7541/2019.111>

五个红罗非鱼群体的遗传多样性分析

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN FIVE RED TILAPIA POPULATIONS

水生生物学报. 2017, 41(2): 326–333 <https://doi.org/10.7541/2017.40>

基于SNP标记的短须裂腹鱼自然群体遗传多样性分析

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF NATURAL POPULATION OF *SCHIZOTHORAX WANGCHIACHII* BASED ON SNP MARKERS

水生生物学报. 2018, 42(2): 271–276 <https://doi.org/10.7541/2018.034>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.061

飘鱼微卫星位点的筛选及珠江流域5个地理群体的遗传多样性分析

阮惠婷¹ 徐姗楠² 李敏³ 戴嘉格¹ 李振海¹ 邹柯姝^{1*} 刘丽^{1*}

(1. 华南农业大学海洋学院, 广州 510642; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广州 510300; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部外海渔业开发重点实验室, 广州 510300)

摘要: 为了解珠江流域飘鱼(*Pseudolaubuca sinensis*)群体间的遗传多样性及其分化程度, 利用RAD-Seq技术开发出微卫星位点, 并设计了100对微卫星引物, 筛选出66个可稳定扩增出目的条带的位点, 其中16个具有较高的多态性($PIC > 0.5$), 以2碱基重复居多。利用其中10对多态性位点对珠江流域的郁江(YuJ)、左江(ZJ)、右江(YJ)、融江(RJ)和桂江(GJ)飘鱼群体进行遗传多样性研究, 得到有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度范围分别为5.2028—6.3800、0.6773—0.7667和0.7975—0.8425, 表明珠江流域5个飘鱼群体具有较高的遗传多样性, 以YuJ群体遗传多样性最高, RJ群体遗传多样性为最低。且群体间各个遗传参数相差较小, 说明他们的遗传多样性水平相近。AMOVA分析显示, 遗传变异主要来自于群体内(98.45%), 仅一小部分的变异来自于群体间(1.55%), 总群体的遗传分化系数 F_{st} 为0.015, 两两群体间的 F_{st} 在-0.0033—0.0295波动, 属于低等程度的分化。群体间基因交流值(N_m)在8.2246—76.0075, 表明群体间基因交流频繁, 对遗传漂变作用的抵制能力较强。研究筛选出了多态性高的微卫星位点, 并利用其对5个飘鱼群体遗传多样性进行评价, 旨在有效地监测飘鱼的种质资源状况, 为其资源的开发利用和保护提供科学指导。

关键词: 飘鱼; 微卫星; 遗传多样性; 珠江流域; 分化

中图分类号: Q346⁺.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)03-0501-08

飘鱼(*Pseudolaubuca sinensis*)属鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鲃亚科(Cultrinae), 俗称银飘鱼、马连刀、蓝刀皮, 是常见的小型鱼类, 其喜栖息于浅水地区, 行动迅速, 常成群结对地漂游于水面^[1]。广泛分布于我国沅江、珠江、闽江、钱塘江、长江、黄河和辽河等水系^[2]。随着生态环境的不断变化, 过度捕捞等, 其资源呈现缩减的趋势^[3,4], 然而目前关于飘鱼的相关研究又寥寥无几, 还未有可靠的数据评估其资源状况。王涵等^[5]曾对其同属的另一种寡鳞飘鱼(*Pseudolaubuca engraulis*)做过长江流域上游区域的早期资源状况调查, 而对珠江流域飘鱼的研究还未有相关报道。

物种的特异性和遗传多样性是评估其资源状况的一种有效途径, 而研究物种遗传多样性最常用

且有效的分子标记方法是微卫星分子标记。微卫星分子标记(SSR)不仅具有丰富的多态性和信息量, 而且重复序列多, 遗传变异水平高, 操作简单, 技术难度低^[6]。发展至今, 微卫星分子标记技术已十分成熟, 被广泛应用于水产动物遗传多样性和遗传结构等领域^[7-9]。随着高通量技术的发展, RAD-seq技术也应运而生, 该技术最大的特点就是简化了基因组的测序, 利用限制性内切酶消化基因组, 再对特定的酶消化片段进行高通量测序, 不仅降低了基因组的复杂度, 而且可以实现基因的分型, 在分子标记的研究中具有很大的应用价值^[10]。近年来, 二代测序技术越来越成熟其测序成本也随之降低, 因此RAD-Seq技术也得到了迅速的发展, 被广泛应用于不同的学科, 特别是在分子标记开发方面

收稿日期: 2019-05-16; 修订日期: 2019-10-28

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2018YFD0900802); 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室开放课题(FREU2015-09); 中国-东盟海上合作基金(CAMC-2018F)资助 [Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFD0900802); the Key Laboratory Project of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R. China (FREU2015-09); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F)]

作者简介: 阮惠婷(1994—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水生生物遗传多样性。E-mail: 1054741781@qq.com

通信作者: 邹柯姝(1987—), 女, 博士, 讲师; 研究方向为水生生物多样性。E-mail: zoukeshu@scau.edu.cn; 刘丽(1964—), 女, 博士, 教授; 研究方向为水产种质资源的开发、利用与保护。E-mail: liuli@scau.edu.cn *共同通信作者

的研究^[11]。周晓君等^[12]就利用RAD-seq技术开发灵宝杜鹃(*Rhododendron henanecse*)的SSR标记并对其进行筛选,在合成的100对引物中有87对可稳定扩增出目的条带,61对具有多态性,扩增率和多态性占比都较高。Yu等^[13]运用RAD-seq技术对点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的生长性状进行全基因组关联分析,开发了261366个单核苷酸多态性(SNP),其中110个SNP被鉴定为与生长相关,并且证实20个SNP与体重和总长度相关。本研究以5个飘鱼地理群体为对象,利用RAD-seq技术开发适用于飘鱼种质资源评估的微卫星标记,并利用其对珠江流域5个飘鱼进行群体遗传学分析,以期对飘鱼野生资源的开发利用和保护提供科学指导,有效地评估飘鱼的种质资源状况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生飘鱼样品主要采集于桂平、横县、扶绥、龙州、融安、田阳、昭平7个地点,分属于郁江、右江、左江、融江和桂江5个江段,每一江段即为一个群体,样品采集信息见表1和图1。剪取背部肌肉放入5 mL无菌离心管中,加无水乙醇脱

表1 样品采集信息

Tab. 1 Experimental materials

所属水系(简称)River system (abbreviation)	采集地点Collection site	样品数量Sample quantity	样品编号Sample number
郁江YuJ	桂平	25	YuJ 01-25
	横县	11	YuJ 26-36
左江ZJ	扶绥	23	ZJ 01-23
	龙州	13	ZJ 24-36
融江RJ	融安	16	RJ01-15
右江YJ	田阳	15	YJ01-16
桂江GJ	昭平	22	GJ01-22

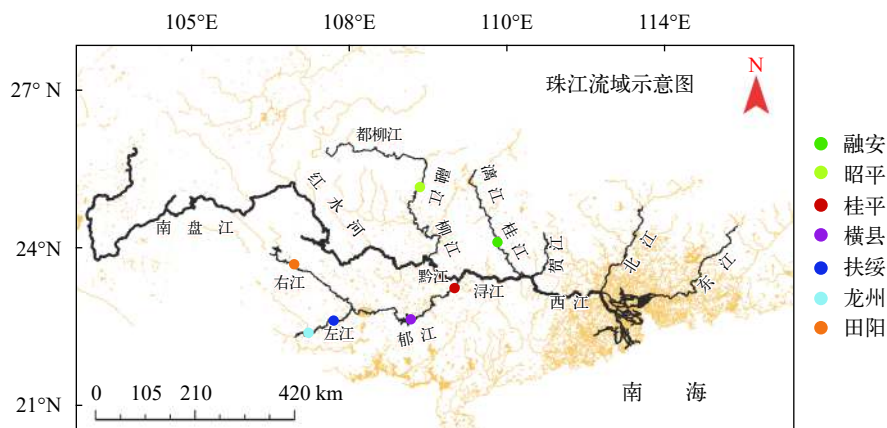


图1 采样点分布图

Fig. 1 The map of sampling

水,期间置换3—4次,放在4℃冰箱中保存待用。

1.2 实验方法

DNA的提取及保存 基因组DNA的提取参考海洋动物组织DNA提取试剂盒(天根,北京)的方法步骤提取,获得的基因组DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用微量分光光度计检测浓度与质量,将合格的DNA样品置于-20℃冰箱保存,直至PCR扩增。

微卫星位点的开发及其引物设计与合成 通过HiSeq 2000高通量测序仪(Illumina, USA)进行测序,并运用SR Search软件寻找微卫星位点。其中测序量设定为2 Gbp,搜索条件:微卫星重复单元长度2—4 bp;重复单元重复数 ≥ 5 ;微卫星位点侧翼序列 ≥ 250 bp,此测序服务由广州基迪奥生物科技有限公司完成。使用Premier 5.0软件进行微卫星引物的设计,引物长度为20—30 bp, T_m 值为55—68℃,预计产物长度150—300 bp。将设计出的引物委托天一辉远公司合成,共合成了100对普通引物,将其命名为YP 001-100,本实验所有的引物均由该公司合成。

微卫星位点初筛及PCR扩增 随机选取4条飘鱼个体基因组DNA对100对引物进行PCR扩增,PCR反应体系为25 μ L,组分体积如下:10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture(2.5 mmol/ μ L)2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/ μ L)2 μ L, TaKaRa Taq酶(5 U/ μ L)0.2 μ L, DNA模板1 μ L,上游引物(5'端, 10 pmol/ μ L)0.5 μ L,下游引物(3'端, 10 pmol/ μ L)0.5 μ L,灭菌去离子水15.8 μ L。PCR反应程序:总变性94℃, 5min;变性94℃, 45s,引物在各自退火温度下复性45s,延伸72℃, 45s, 35个循环;总延伸72℃, 10min。PCR产物与Gold View I型核酸染料混合,经2%琼脂糖凝胶、120 V的电压电泳25min后在凝胶成像系统检测目的条带,选出能稳定扩增出清晰目的条带的引物。

位点的多态性检测和验证 将能稳定扩增的引物合成荧光引物, 即在上游引物5'端添加荧光标记FAM。用合成的荧光引物先对4个飘鱼个体进行PCR扩增后经毛细管电泳检测, 根据峰图筛选呈现多态性的位点。以24个飘鱼个体为模板, 用多态性位点再进行PCR扩增和毛细管分析做进一步验证, 最终筛选出多态性较高的位点, 并将其用于后续珠江流域5个飘鱼群体的遗传多样性分析。

数据处理 根据各微卫星位点的基因片段长度进行基因分型, 利用Popgene 1.32软件^[14]计算群体的遗传参数, 包括观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon's Index(I)和遗传固定指数(F_{is}), 并进行Hardy-Weinberg平衡检验。基于Popgene 1.32得到的基因频率用PIC Calc计算各个位点的多态信息含量(PIC)。用Arlequin 3.5软件^[15]计算两两群体间的遗传分化指数 F_{st} 并做AMOVA分析。通过公式 $N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$ 计算群体间的基因流(N_m)。利用Bottleneck v1.2.02分析软件^[16]进行TPM模型下的sign-test检验。

2 结果

2.1 微卫星位点初步筛选结果

在100对引物中有66对可稳定扩增出条带, 扩增率为66%, 其余34对引物在扩增中呈现不同程度的失败。66对引物经毛细管电泳初步分析, 认为22个是多态性信息含量高的位点。以YP11位点为例, 其电泳分型如图2, 微卫星位点大小分别为238和283、271和286、277和283、271。SSR位点大小的差异是碱基重复次数的不同导致的, 这些差异性也直接反映了位点的多态性, 该位点在这4个样品中表现出较高的多态性。初步筛选出22个微卫星位点, 引物信息如表2所示, 其PCR扩增产物大小161—261, 扩增的退火温度为58—65℃。

2.2 初筛位点验证结果分析

利用24个个体基因组DNA对初筛的22个位点进行验证, 得到16个位点是高多态性的位点, 22个位点的各遗传参数见表2。22个微卫星位点等位基因数介于2—21个, 共检测到了182个等位基因, 有效等位基因为1.0868—14.961个。其中YP 10和YP 19获得的等位基因数最多, YP79最少。22个位点的观测杂合度为0.125—1, 期望杂合度为0.47—0.9184, 平均值分别为0.4564, 0.3102。它们的PIC值在0.07671—0.9292, 香农指数在0.1732—2.8584, 二者均值分别为0.5965和1.5497。在这22个位点中,

有2个位点(YP79、YP91)属于低度多态位点($P<0.25$), 2个位点(YP04、YP75)属于中度多态位点($0.25>PIC<0.5$), 16个位点是高度多态的位点($P>0.5$)。选取其中10个高多态性位点(YP05、YP08、YP10、YP11、YP19、YP23、YP31、YP32、YP37、YP47、YP60)用于群体遗传多样性分析。

2.3 群体遗传多样性分析

对珠江流域5个飘鱼群体进行遗传多样性分析, 5个群体的遗传多样性参数结果见表3。5个群体均表现出较高的遗传多样性水平(平均 $PIC>0.5$), 其中YuJ群体表现出最高的遗传多样性水平(N_a 11.3; N_e 6.6279; H_o 0.7667; H_e 0.8425; I 2.0255; PIC 0.8074), 而RJ群体遗传多样性水平最低(N_a 8.6; N_e 5.2028; H_o 0.7667; H_e 0.7975; I 1.7640; PIC 0.7409)。

2.4 群体间的遗传变异

基于各个群体等位基因频率的不同计算群体间的基因流 N_m 和遗传分化指数 F_{st} (表4)。5个群体间的基因流范围在8.2246—64.3526, ZJ和RJ群体间出现最高的遗传分化(0.0295), 最低基因流(8.246),

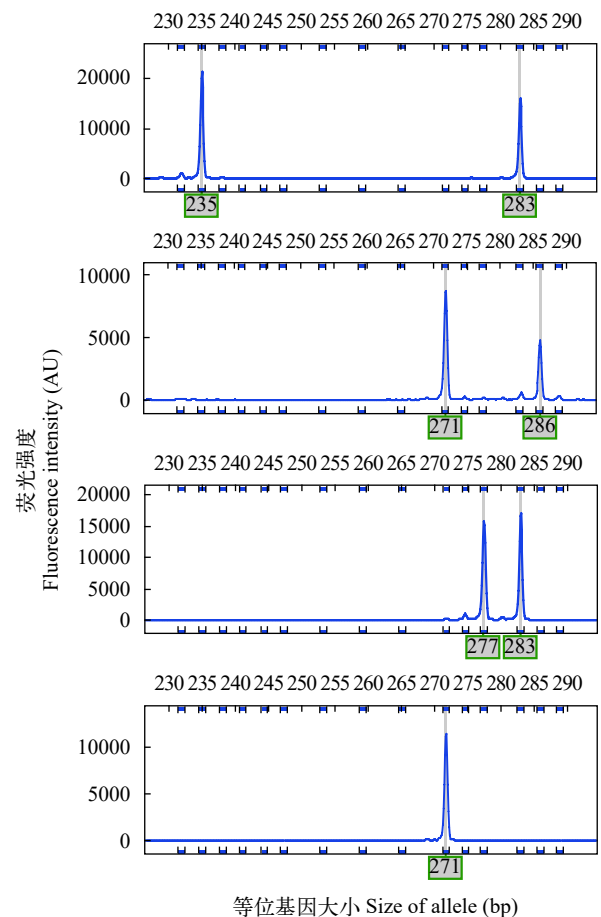


图2 YP11在4个飘鱼个体中的毛细管峰图

Fig. 2 Capillary gel electrophoresis of the primer YP11 in four *Pseudolaubuca sinensis* individuals

而在YJ和RJ群体间为最低的遗传分化(-0.0039), 最高的基因流(64.3526)。AMOVA分析显示, 98.45%的遗传来自于群体内, 1.55%的变异来自于群体间,

群体间呈现出低等程度的分化($F_{st} < 0.05$, 表5)。

2.5 瓶颈效应

对飘鱼5个地理群体进行瓶颈分析, $P > 0.05$ 代

表2 22个微卫星位点的信息及其遗传参数

Tab. 2 Information and genetic parameters of 22 microsatellite loci

引物名 Primer name	核心序列 Repetitive sequence	两端序列 Primer sequence (5'—3')	产物大小 Size (bp)	退火温度 T_m (°C)	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected Heterozygosity (H_e)	香农指数 Shannon's index (J)	多态信息含量 Polymorphic information content (PIC)
YP 04	(AG) ₁₀	CACAAAAACAGAGGGAGAG CA TTCCGCCATTTATATCCAGG	261	59	4	1.8228	0.5	0.539	0.8359	0.4041
YP 05	(TA) ₁₃	GCCACAATAACGTGGTGTGA TGTCCATCGTAAACAGCATGA	110	59	9	5.3581	0.25	0.1693	1.8692	0.7889
YP 08	(AG) ₁₁	TTCTGTGGAATTTATTCTGTG TGA TGACAGGGAGAAAGGGAGA A	188	58	8	5.4857	0.3333	0.1649	1.8586	0.7956
YP 10	(TG) ₂₄	CCACAATAACCGTGGTGTGA AGCATTGGCGAGCATAAGAT	204	59	21	10.5688	0.4583	0.0754	2.6812	0.8985
YP 11	(ATA) ₇	AGGGTTTGGGTTTGTGTTGTG GGGACATTAAGTGCTCTCCA A	275	61	9	6.9818	0.2917	0.125	2.0373	0.8402
YP 19	(AATG) ₁₂	TTCAGAATGACATGAGTGTG AGAA TTTCTTCAGGCGTACAGTCG	167	58	21	14.961	0.125	0.047	2.8584	0.9292
YP 23	(GT) ₁₃	AAATGTCAGGCATTACAGGG TT TGTGAGATGAAAATGTCGCA A	222	59	9	5.6749	0.4167	0.1587	1.9271	0.8025
YP 31	(AAC) ₆	TTCTCGTCGAGGAATCAGGT CACAAAGAGGGGAAGGACA A	243	58	7	3.3103	0.2917	0.2872	1.4352	0.6548
YP 32	(ATAG) ₆	TGCAAGACGTAGAGCATCG AAGCACTTTAAAAAGCGTGA GG	251	60	11	6.7368	0.4583	0.1303	2.1257	0.8364
YP37	(GT) ₁₁	CAGAATGTCCATGCTGCTTT TGTTGTGCTCAGGGTTTGTC	166	57	9	5.5922	0.125	0.1613	1.9107	0.8002
YP47	(CA) ₁₁	TGGAGTGCTAGATGAGGGCT GAATTATAAGTGTAATGTGA GGGGG	193	59	5	2.5946	0.375	0.3723	1.2026	0.5691
YP50	(ATA) ₆ ac aataataa ac(AAT) ₅	CCTGTTCTGTTTGTCTTTTIG A AGGTTATTGGACCCCTGAT	214	59	5	2.7429	0.5	0.3511	1.1497	0.5639
YP58	(TTTAA) ₆	TGTGACACCGTCTGTCTTCC GACATGGGGGTGAGTGAAAT	173	57	6	3.8919	0.2917	0.2411	1.5131	0.7027
YP61	(CA) ₉	CCCAAAAGGAGGTTTGTGCA GAATGTCCCCACAATCAC	183	63	9	3.4491	0.3333	0.2748	1.5733	0.6740
YP65	(GA) ₈	CGGGAGAGCGAAGTAAACT G TGACTGCACAAGGCAGATTC	234	56	11	5.8477	0.2083	0.1534	2.0174	0.8105
YP69	(TA) ₇	AGAATTGACGCTGTGGGAAC TTTTGGCTGCACTAGGCG	161	56	11	4.4825	0.125	0.2066	1.9007	0.7579
YP70	(AT) ₉	GAGTTCCCAGATCGCTTGTC TCCTAAATGGCAACGAGTCC	171	56	5	3.9051	0.9583	0.2402	1.4461	0.6996
YP73	(ATT) ₆	CATTTTTGTCTTGATGCTACG C AAAACCAGCAGGGTTTCTGA	255	56	7	2.8029	0.375	0.3431	1.3158	0.5948
YP75	(CT) ₁₂	TTGTATGCCTTGCATCCTG CAACAGCAGCTTCTGCACTC	235	56	5	1.3585	0.75	0.7305	0.6016	0.2543
YP79	(AC) ₁₄	TAATCGGCCTGCTGGATTAG AAAGCAGTCTTGAAGCGGAA	275	58	2	1.0868	1	0.9184	0.1732	0.07671
YP88	(TA) ₆	GCCCTACAATCAGCAAAGTA AA CGCATTAGCCTCCTTTATGC	187	55	5	2.9091	1	0.3298	1.2566	0.6053
YP91	(AAAT) ₆	CGCCAGGGAAATTATTTTGA GCCATTAAGTCACCAGTTA ATCA	278	55	3	1.2374	0.875	0.8041	0.4042	0.1828
Mean					9.2778	4.6728	0.4564	0.3102	1.5497	0.5965

表 3 五个飘鱼群体的遗传多样性参数

Tab. 3 Genetic diversity parameters in five populations of *P. sinensis* from the Pearl River Basin

群体Population	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基因 Effective number of alleles (N_e)	观测杂合度 Observed Heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	香农指数 Shannon's Index (I)	多态信息含量 Polymorphic information content (PIC)
GJ	10.1	5.9406	0.6773	0.8165	1.9041	0.7727
RJ	8.6	5.2028	0.7667	0.7975	1.7640	0.7409
YuJ	11.3	6.6279	0.7233	0.8425	2.0255	0.8074
YJ	8.6	5.8498	0.7257	0.8196	1.8383	0.7665
ZJ	10.8	6.3800	0.7167	0.8212	1.9632	0.7856
Mean	9.9	6.0002	0.7219	0.8195	1.8990	0.7746

表群体近期没有经历瓶颈效应(表 6), 结果显示, 5个群体都未偏离突变-漂移平衡, 说明近期都未经历过遗传瓶颈。所有群体模式迁移均符合标准的L-型分布(表 6), 模式迁移图如图 3所示。

3 讨论

3.1 RAD-Seq技术的优势

RAD-Seq技术是在高通量测序技术的基础上, 利用酶切技术进行大批量分子标记开发的测序技术, 其优点主要体现在测序成本低、精确度和分辨率高, 而且在基因组信息有限的情况下还能够大规模进行SNP检测和分型, 可快速完成变异检测以及其他的生物学分析^[18, 19]。从研究成本来说, 测序分

表 4 群体间的基因流 N_m (对角线左下角)和遗传分化系数 F_{st} 及其 P 值(对角线右上角)

Tab. 4 Gene flow N_m (below diagonal) and the genetic differentiation coefficient F_{st} and its P -value (above diagonal) among five populations of *P. sinensis*

群体 Population	GJ	RJ	YuJ	YJ	ZJ
GJ		F_{st} 0.0043 P 0.2522	F_{st} 0.0126 P 0.0360	F_{st} 0.0080 P 0.2072	F_{st} 0.0208 P 0.0000
RJ	57.8 895		F_{st} 0.0154 P 0.0180	F_{st} -0.0033 P 0.7477	F_{st} 0.0295 P 0.0000
YuJ	19.5 913	15.9838		F_{st} 0.0106 P 0.0360	F_{st} 0.0180 P 0.0000
YJ	31.0 000	76.0075	23.3349		F_{st} 0.0179 P 0.0000
ZJ	11.7 692	8.2246	13.6389	13.7165	

表 5 五个飘鱼群体间的分子方差分析

Tab. 5 AMOVA analysis of five populations of *P. sinensis*

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance component	变异百分比 Percentage variation	分化系数 数 F_{st}	P
群体间 Among populations	4	24.102	0.056	1.55	0.0155	0.000
群体内 Within populations	221	784.668	3.551	98.45		
总Total	225	808.770	3.606			

析开发多态性SSR的成本比选用前人开发的SSR标记会更低, 由于后者可用的多态性标记水平低, 所耗费的时间和精力会增加^[20]。本研究运用RAD-Seq技术开发SSR位点并进行筛选, 不仅减少了引物合成的成本, 同时也减少了SSR位点筛选过程中的工作量, 省时省力。基于上述技术的优点能够更好的对野生飘鱼群体遗传多样性进行分析。本研

表 6 五个种群在TPM突变模型假设下sign test检验结果

Tab. 6 Analysis of the possibility of a recent bottleneck using sign tests in the five *P. sinensis* populations

群体Population	TPM		
	H_e/H_D	P	Mode-Shift
GJ	2/8	0.1777	L型
RJ	3/7	0.3718	L型
YuJ	4/6	0.6301	L型
YJ	2/8	0.1639	L型
ZJ	3/7	0.3855	L型

注: H_e/H_D : 杂合子过剩的个体数量与杂合子缺失的数量之比; $P>0.05$ 表示群体没有经历最近的瓶颈

Note: H_e/H_D : ratio of the number of individuals with heterozygosity excesses to the number with heterozygosity deficiency; $P>0.05$ indicates that the population has not experienced a recent bottleneck

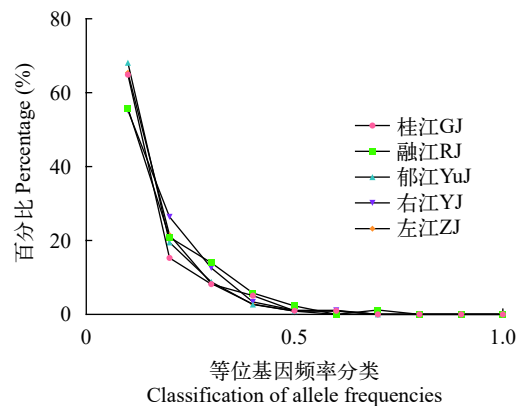


图 3 五个飘鱼群体遗传瓶颈效应分析的模式迁移图

Fig. 3 Mode-shift analysis for the test of the genetic bottleneck of five *P. sinensis* populations

究设计并合成了100对引物,并在多个飘鱼个体基因组DNA中进行验证分析,获得16个多态性较高的位点,利用这些位点对飘鱼进行种群遗传多样性分析,得到的结果具有一定的参考价值。

3.2 珠江流域5个飘鱼群体的遗传多样性分析

多态信息含量(PIC)是衡量等位基因片段多态性的理想指标,当 PIC 大于0.5时,为高度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态位点; PIC 小于0.25时为低度多态位点^[20]。筛选出的16个微卫星位点的 PIC 均大于0.5,说明这16个基因座的都属于高多态位点,能有效评估飘鱼群体的遗传多样性及遗传结构。香农指数(I)是反映种群均匀性分布和群体内个体遗传变异程度的一个重要指标,一般情况下香农指数在1.5—3之间^[21, 22]。平均 I 值为0.5969,表明飘鱼群体是随机的分布和交配。比较5个群体的 PIC 值和 I 值, $YUJ > ZJ > GJ > YJ > RJ$ (表4),范围在0.7409—0.8074,总群体的 PIC 为0.7746,说明5个飘鱼群体的遗传多样性丰富。

杂合度是评价种群遗传多样性的重要参数,但观测杂合度(H_o)很容易受到样本量的影响,因此期望杂合度(H_e)可以更好地反映遗传多样性水平^[23],而且遗传多样性越丰富的物种其杂合度也会越高,适应环境的能力也越强^[24]。本研究结果显示,5个群体的期望杂合度在0.7975—0.8425(表4),表现出较高的遗传多样性水平,其中以 YuJ 群体为最高的, RJ 群体为最低,与 PIC 值和 I 值分析得到的结果相一致。5个群体的观测杂合度均比其期望杂合度小,说明存在杂合子缺失的现象,在 TPM 突变模型假设下 $sign$ test检验结果也验证了这一点,其结果也表明5个飘鱼群体均未偏离突变-漂移平衡,未经历瓶颈效应。影响动植物遗传多样性的因素很多,包括其生长特性和生活习性、生活的环境及地理分布、繁衍后代的方式、物种的进化地位等^[25]。虽然水质污染及拦河筑坝、挖沙等人类活动已造成渔业生态环境的严重恶化^[3],这些变化能够间接的引起种群遗传结构的改变,但由于飘鱼应对环境变化的能力较强,其遗传多样性受到的影响小,仍具有较高的遗传多样性。

3.3 群体间的遗传分化与基因流

遗传分化指数 F_{st} 是目前广泛应用的一个评价群体间遗传分化程度的重要依据,与群体间基因流(N_m)具有内在的联系,二者之间呈负相关的关系,遗传分化指数越低,基因流越大^[26, 27]。当 $F_{st} < 0.05$ 时,说明群体间的遗传分化较低;当 $0.05 < F_{st} < 0.15$ 时,群体属于中等程度的遗传分化;当 $0.15 < F_{st} < 0.25$ 时,则群体间存在较大的遗传分化;当 $F_{st} > 0.25$

时,说明群体间分化极大^[27]。飘鱼两两群体间的 F_{st} 为-0.0033—0.0295,均小于0.05,属于低等程度的遗传分化。 $AMOVA$ 分析显示,遗传变异主要来自于群体内(98.45%),仅一小部分的变异来自群体间(1.55%),总群体的 F_{st} 为0.015,说明珠江流域5个飘鱼群体处于极低的遗传分化状态。基因流(N_m)是指一个群体因为另一群体一些个体的迁移而带入某些基因,这些基因的流动会对该群体的变异产生影响。 $Slatkin$ 指出,基因流必须超过一定水平以防止由于遗传漂变导致的实质性遗传分化,遗传漂变对所有核基因具有相同的平均效应,群体中任何基因流都将阻止完全固定^[28]。一般认为 $N_m > 1$,群体间的基因交流顺畅,足以抵制遗传漂变的作用,防止群体间发生遗传分化^[29]。本研究5个群体的 N_m 值在8.2246—76.0075波动(表5),表明5个群体间基因交流频繁,抵抗遗传漂变的能力较强,遗传分化低。研究表明,广西境内分布着珠江鱼类大部分的产卵场,这些产卵场主要集中在郁江、左江及右江,卵随流水漂流是促进种群基因交流的一种途径^[30]。使产卵场功能丧失或衰退的主要因素是涉水工程建设,尤其是对产漂浮性卵的鱼类^[31]。有调查结果显示,在金沙江一期工程蓄水后长江上游产漂浮性卵鱼类资源量严重下降,种类减少了10余种^[32]。据了解,2000年前郁江干流仅有4座水利枢纽,但在2000后短短的十几年就新增了18座水利梯级^[33]。虽然本研究显示飘鱼各群体间的基因交流仍较高,但水利工程建设对其渔业资源的影响不可忽视,仍需持续监测。

4 结论

遗传多样性是群体中遗传信息的总和,是群体持久性,适应性和进化的必要条件,自然群体中的遗传多样性源于漂移,迁移,突变和选择的相互作用^[34]。遗传多样性和分子系统数据有助于物种的有效开发利用和管理。本研究开发出16个适用于飘鱼群体遗传学分析、多态性高的微卫星位点,可用于飘鱼的种质资源评估。本研究表明珠江流域5个飘鱼群体具有较高的遗传多样性,种质资源现状较好,具有较大的开发利用潜力。但随着渔业资源的不断开发与利用,捕捞范围的逐渐扩大,野生鱼类的渔业资源基本都呈现逐步减少的趋势,因此有必要对野生飘鱼扩大范围及更深入的研究,为飘鱼的资源保护与利用提供更可靠的科学指导。

参考文献:

- [1] Wu X W. Chinese Economic Animal, Freshwater Fishes

- [M]. Beijing: Science Press, 1979: 48. [伍献文. 中国经济动物志 淡水鱼类 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 48.]
- [2] Zhuang P. Fish of the Yangtze Estuary [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Press, 2006: 1-497. [庄平. 长江口鱼类 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1-497.]
- [3] Liu T R, Deng W X, Xu Z X, *et al.* Analysis on fishery on the western backward position of Pearl River [J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2008, **26**(2): 81-87. [刘添荣, 邓伟兴, 许梓晓, 等. 珠江流域西江下游渔业现状调查与分析 [J]. *中国渔业经济*, 2008, **26**(2): 81-87.]
- [4] Li J, Li X H, Jia X P, *et al.* Evolvement and diversity of fish community in Xijiang River [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, **17**(2): 298-311. [李捷, 李新辉, 贾晓平, 等. 西江鱼类群落多样性及其演变 [J]. *中国水产科学*, 2010, **17**(2): 298-311.]
- [5] Wang H, Tian H W, Chen D Q, *et al.* Early resource investigation of *Pseudolaubuca engraulis* (Nichols) in the Jiangjin section of the upper Yangtze River [J]. *Journal of Hydroecology*, 2017, **38**(2): 82-87. [王涵, 田辉伍, 陈大庆, 等. 长江上游江津段寡鳞飘鱼早期资源研究 [J]. *水生态学杂志*, 2017, **38**(2): 82-87.]
- [6] Yang W Y, Zheng J J, Jia B Y, *et al.* SSR marker and its research progress to animal genetics and breeding [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, **36**(11): 4644-4649. [杨万云, 郑军军, 贾博寅, 等. 微卫星分子标记及其在动物遗传育种中的研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, **36**(11): 4644-4649.]
- [7] Li K, Ma X F, Xie P, *et al.* Genetic diversity and population genetic structure of *Rutilus rutilus* based on microsatellite genetic markers [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2018, **37**(4): 112-120. [李可, 马徐发, 谢鹏, 等. 基于微卫星标记的拟鲤遗传多样性及群体遗传结构分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2018, **37**(4): 112-120.]
- [8] Sun C F, Xie W F, Hu J, *et al.* Genetic diversity analysis of three cultured populations of *Micropterus salmoide* [J]. *South China Fisheries Science*, 2019, **15**(2): 64-71. [孙成飞, 谢汶峰, 胡婕, 等. 大口黑鲈3个养殖群体的遗传多样性分析 [J]. *南方水产科学*, 2019, **15**(2): 64-71.]
- [9] Yan Y J, Cao Z M, Ding W D, *et al.* On genetic diversity analysis of 6 populations of *Siniperca chuatsi* in Jiangsu province [J]. *Marine Fisheries*, 2019, **41**(1): 25-33. [颜元杰, 曹哲明, 丁炜东, 等. 江苏省6个翘嘴鲈群体的遗传多样性分析 [J]. *海洋渔业*, 2019, **41**(1): 25-33.]
- [10] Andrews K R, Good J M, Miller M R, *et al.* Harnessing the power of RAD-seq for ecological and evolutionary genomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, **17**(2): 81-92.
- [11] Liu T, Li R, Xiao H, *et al.* Research progress of RAD-seq in fish genomics [J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2018, **40**(6): 1283-1289. [刘涛, 李蓉, 肖衡, 等. RAD-seq技术在鱼类基因组学中的研究进展 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2018, **40**(6): 1283-1289.]
- [12] Zhou X J, Wang H L, Li F L, *et al.* Development of polymorphic SSR markers in *Rhododendron henanense* subsp. *lingbaoense* based on RAD-seq [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, **27**(1): 55-62. [周晓君, 王海亮, 李方玲, 等. 基于RAD-seq技术开发灵宝杜鹃多态性SSR标记 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, **27**(1): 55-62.]
- [13] Yu H, You X, Li J, *et al.* A genome-wide association study on growth traits in orangespotted grouper (*Epinephelus coioides*) with RAD-seq genotyping [J]. *Science China (Life Sciences)*, 2018, **61**(8): 934-946.
- [14] 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.
- [15] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**(3): 564-567.
- [16] Piry S, Luikart G, Cornuet J M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data [J]. *Journal of Heredity*, 1999, **90**(4): 502-503.
- [17] Wang Y K, Hu Y, Zhang T Z, *et al.* Current status and perspective of RAD-seq in genomic research [J]. *Hereditas*, 2014, **36**(1): 41-49. [王洋坤, 胡艳, 张天真, 等. RAD-seq技术在基因组研究中的现状及展望 [J]. *遗传*, 2014, **36**(1): 41-49.]
- [18] Hu J J, Ren H Y. Principle and applications of RAD-seq in studies of aquatic organisms [J]. *Fisheries Science*, 2018, **37**(1): 125-132. [胡景杰, 任红艳. RAD测序技术及其在水生生物研究中的应用 [J]. *水产科学*, 2018, **37**(1): 125-132.]
- [19] Li H Y, Li R H, Xia Y S, *et al.* Development of polymorphic SSR markers in Tobacco based on RAD sequencing [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2018, **39**(1): 1-9. [李海洋, 李荣华, 夏岩石, 等. 基于RAD-seq数据开发烟草多态性SSR标记 [J]. *中国烟草科学*, 2018, **39**(1): 1-9.]
- [20] Botstein D. Construction genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**(3): 314-331.
- [21] Teng Y K, Liu X J, Zhang X, *et al.* Microsatellite marker design and genetic analysis for the common marmoset [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2018, **28**(6): 15-20, 28. [滕永康, 刘先菊, 张旭, 等. 实验用狨猴微卫星引物筛选及遗传多样性分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, **28**(6): 15-20, 28.]
- [22] Zhang M Z. The genetic diversity of geographical populations of the migratory locust analyzed with the percent of polymorphic loci and Shannon's index [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, **24**(9): 376-381. [张民照. 用多态位点率和香农指数分析的飞蝗地理种群遗传多样性 [J]. *中国农学通报*, 2008, **24**(9): 376-381.]
- [23] Qin Y, Sun D Q, Xu T J, *et al.* Genetic diversity and population genetic structure of the miyu croaker, *Micichthys miyu*, in the East China Sea by microsatellite markers [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, **13**(4): 10600-10606.
- [24] Qin Y, Shi G, Sun Y. Evaluation of genetic diversity in *Pampus argenteus* using SSR markers [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, **12**(4): 5833-5841.
- [25] Hamrick J L, Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1996, **351**(1345): 1291-1298.

- [26] Mao S K, Ma A J, Ding F H, *et al.* Analysis of genetic structures of our wild geographoic populations of mullet *Liza haematocheila* by using microsatellite marker technique [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, **37**(2): 68-75. [毛守康, 马爱军, 丁福红, 等. 梭鱼(*Liza haematocheila*) 4个野生地理群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. *渔业科学进展*, 2016, **37**(2): 68-75.]
- [27] Wright S. Variability Within and Among Natural Populations [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- [28] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, 1987, **236**(4803): 787-792.
- [29] Slatkin M, Slatkin N, Slatkin D N. Gene flow in natural populations [J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 1985, **16**(1): 393-430.
- [30] Tan X, Kang M, Tao J, *et al.* Hydroacoustic survey of fish density, spatial distribution, and behavior upstream and downstream of the Changzhou Dam on the Pearl River, China [J]. *Fisheries Science (Tokyo)*, 2011, **77**(6): 891-901.
- [31] Li J, Luo J R, Li X H, *et al.* Investigation of fish resources and analysis of resources decline along Lianjiang River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, **37**(3): 49-53. [李捷, 罗建仁, 李新辉, 等. 连江鱼类资源现状调查及资源衰退原因分析 [J]. *淡水渔业*, 2007, **37**(3): 49-53.]
- [32] Duan X B, Tian H W, Gao T H, *et al.* Resources status of ichthyoplankton in the upper Yangtze River before the storage of Jinsha River first stage project [J]. *Resources and Environment in The Yangtze Basin*, 2015, **24**(8): 1358-1365. [段辛斌, 田辉伍, 高天珩, 等. 金沙江一期工程蓄水前长江上游产漂流性卵鱼类产卵场现状 [J]. *长江流域资源与环境*, 2015, **24**(8): 1358-1365.]
- [33] Xu T Z, Li X H, Li Y F, *et al.* Status of early resources in Yujiang Jinling River section [J]. *South China Fisheries Science*, 2018, **14**(2): 19-25. [徐田振, 李新辉, 李飞跃, 等. 郁江中游金陵江段鱼类早期资源现状 [J]. *南方水产科学*, 2018, **14**(2): 19-25.]
- [34] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. *New Forests*, 1992, (6): 95-124.

MICROSATELLITE PRIMERS SCREENING AND GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF FIVE GEOGRAPHICAL POPULATIONS OF *PSEUDOLAUBUCA SINENSIS* IN THE PEARL RIVER BASIN

RUAN Hui-Ting¹, XU Shan-Nan², LI Min³, DAI Jia-Ge¹, LI Zhen-Hai¹, ZOU Ke-Shu¹ and LIU Li¹

(1. College of Marine Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agricultural and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Key Laboratory of Open-Sea Fishery Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: To explore the genetic diversity and differentiation degree of *Pseudolaubuca engraulis* population in the Pearl River Basin, RAD-Seq technology was used to develop microsatellite loci. A total of 100 pairs of microsatellite primers were designed, 66 of which could stably amplify the target band, including 16 polymorphic microsatellite markers ($PIC > 0.5$) which were mostly with 2 base repeats. Ten polymorphic microsatellite loci were used in genetic diversity analysis in five *P. sinensis* populations of Pearl River Basin (YuJ, ZJ, YJ, RJ, GJ). The effective allele number, observed heterozygosity, and expected heterozygosity varied from 5.2028—6.3800, 0.6773—0.7667, and 0.7975—0.8425, respectively. The results showed that five *P. sinensis* populations in the Pearl River Basin had a high level of genetic diversity level, the YJ population had the highest genetic diversity while the RJ population had the lowest. The genetic parameters of population differed little, indicating that their genetic diversity level was close. AMOVA analysis showed that the genetic variation mainly come from population (98.45%), and only a small part of the variation came from different population (1.55%). The genetic differentiation coefficient F_{st} of the total population was 0.015, which was a low degree of differentiation. The gene exchange value (N_m) was between 8.2246 and 64.3526. The results showed that there were frequent gene exchange in different populations and strong resistance to genetic drift. This study screened microsatellite loci with high polymorphism and used the loci to evaluate the genetic diversity of the *P. sinensis* population, aiming to effectively monitor the germplasm resources of *P. sinensis* and to provide scientific guidance for its resource development, utilization and protection.

Key words: *Pseudolaubuca sinensis*; Microsatellite; Genetic diversity; the Pearl River Basin; Differentiation