

基于高通量测序的厚唇裸重唇鱼 微卫星分子标记筛选

刘峰林^① 王泽松^① 王太^② 邓嘉俊^①
王小东^③ 金燕君^① 宋昭彬^{①④*}

① 四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610065; ② 甘肃省水产科学研究所, 甘肃省冷水性鱼类种质资源与遗传育种重点实验室 兰州 730030; ③ 四川大学自然博物馆 成都 610065; ④ 四川大学生命科学学院, 长江上游鱼类资源与环境四川省野外科学观测研究站 成都 610065

摘要: 本研究对厚唇裸重唇鱼 (*Gymnodiptychus pachycheilus*) 基因组进行 Illumina HiSeq 高通量测序, 共获得 85 905 条序列, 包含 567 200 个微卫星位点, 从中筛选出 15 个微卫星位点, 采用雅砻江新龙种群和黄河渭河种群对其多态性进行了验证。新龙种群中, 15 个位点的平均等位基因数为 6.9 (3~13), 观测杂合度 (H_0) 为 0.712 4, 多态信息含量 (PIC) 为 0.630 3, 有 8 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡, 1 对位点表现出连锁。渭河种群中, 15 个位点的平均等位基因数为 8.4 (4~16), 观测杂合度 (H_0) 为 0.719 5, 多态信息含量 (PIC) 为 0.680 7, 有 7 个位点显著偏离了哈迪-温伯格平衡, 4 对位点表现出连锁。筛选获得的 15 个微卫星位点多态性较高, 适合用于厚唇裸重唇鱼种群遗传学研究。

关键词: 厚唇裸重唇鱼; 高通量测序; 微卫星分子标记

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 06-817-10

Isolation and Characterization of Microsatellite Loci for *Gymnodiptychus pachycheilus* by Illumina HiSeq Sequencing

LIU Feng-Lin^① WANG Ze-Song^① WANG Tai^② DENG Jia-Jun^①
WANG Xiao-Dong^③ JIN Yan-Jun^① SONG Zhao-Bin^{①④*}

① Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065; ② Gansu Key Laboratory of Cold Water Fishes Germplasm Resources and Genetics Breeding, Gansu Fisheries and Science Research Institute, Lanzhou 730030; ③ Museum of Natural History, Sichuan University, Chengdu 610065;

④ Observation and Research Station of Sichuan Province of Fish Resources and Environment in Upper Reaches of the Yangtze River, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: [Objectives] Microsatellite markers have been widely used in the research of conservation genetics of aquatic animals. However, there is no report on microsatellite loci of *Gymnodiptychus pachycheilus*.

* 通讯作者, E-mail: zbsong@scu.edu.cn;

第一作者介绍 刘峰林, 男, 硕士研究生; 研究方向: 保护遗传学; E-mail: 851404480@qq.com.

收稿日期: 2022-11-26, 修回日期: 2023-04-28 DOI: 10.13859/j.cjz.202322297

[Methods] From 2014 to 2022, a total of 2 *G. pachycheilus* populations (56 individuals) were collected from the main stream of the middle Yalong River and Weihe River. Illumina HiSeq sequencing was used to explore microsatellite markers from the genome of *G. pachycheilus*. Microsatellite loci were tested using 2 wild population samples' DNA of *G. pachycheilus*. Null alleles were tested using the software MICRO-CHECKER version 2.2.3, genetic diversity statistics were obtained using AUTOTET. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium at each locus were calculated using GENEPOP 4.7.5, and significance values were adjusted after applying Bonferroni correction. Polymorphism information content (PIC) value was based on PIC_Calc0.6. **[Results]** 567 200 microsatellite loci were identified from 85 905 individual sequence reads produced, and 15 primer pairs were designed and testified in the Yalong River Xinlong population and the Weihe River population. In the Xinlong population, the average number of observed alleles per locus was 6.87 (from 3 to 13), the average observed heterozygosities and PIC were 0.712 4 and 0.630 3 respectively, 1 pair linkage disequilibrium was detected and eight loci showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium among the loci (Table 2). In the Weihe population, the average number of observed alleles per locus was 8.4 (from 4 to 16), the average observed heterozygosities and PIC were 0.719 5 and 0.680 7 respectively, 4 pairs linkage disequilibrium was detected and 7 loci showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium among the loci (Table 3). **[Conclusion]** These 15 high polymorphism microsatellite loci described for *G. pachycheilus* will be useful for future study on phylogeography and genetic diversity studies.

Key words: *Gymnodiptychus pachycheilus*; High-throughput sequencing; Microsatellite

厚唇裸重唇鱼 (*Gymnodiptychus pachycheilus*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 裸重唇鱼属, 属于特化等级的裂腹鱼类, 包括厚唇裸重唇鱼指名亚种 (*G. pachycheilus pachycheilus*) 和厚唇裸重唇鱼渭河亚种 (*G. pachycheilus weiheensis*) (张艳萍等 2013, Su et al. 2014), 仅分布于兰州以上黄河上游及雅砻江中上游干支流及湖泊 (丁瑞华 1994, 李柯懋等 2012), 其肉质多脂、营养丰富, 曾为当地重要经济鱼类 (杜岩岩等 2016)。由于受过度捕捞、水体污染等人类活动的影响, 厚唇裸重唇鱼分布区范围缩小, 种群数量锐减, 现已被《中国脊椎动物红色名录》列为濒危级物种 (蒋志刚 2021), 国家二级重点保护野生动物 (中国林业和草原局等 2021)。同时, 雅砻江流域水电开发导致河流水文条件明显改变, 河道阻隔, 可能会对厚唇裸重唇鱼的自然繁殖和种群间基因交流等造成影响 (蒋红等 2007, 梅朋森

等 2009), 评估其遗传多样性和种群结构对制定有效的保护策略至关重要。

裂腹鱼类作为鲤科鱼类中适应青藏高原恶劣环境最成功的类群, 进化出许多独特的特征以适应缺氧和寒冷环境, 因此它们被认为是研究鱼类高海拔适应的优秀模型。根据鳞片、咽齿和触须的特化程度, 裂腹鱼可分为原始、特化和高度特化三个等级, 这些形态特征的有序减少或退化与青藏高原三个阶段的剧烈动荡所造成的剧烈环境变化密切相关 (何德奎等 2007)。厚唇裸重唇鱼作为特化等级的裂腹鱼, 筛选合适的微卫星标记探究其遗传结构成因, 对追溯青藏高原隆起及其对古气候环境演化的影响具有特殊意义。

微卫星标记 (microsatellite) 被广泛应用于水生动物的保护遗传学研究 (Sun et al. 2018, Fernández-Pérez et al. 2019, Razak et al. 2019), 然而目前针对厚唇裸重唇鱼分子遗传学研究主要采用的是线粒体分子标记, 尚未见利用微卫

星标记的报道。线粒体基因属于母系遗传，在全面准确分析物种遗传多样性方面存在一定的缺陷，所以要更准确分析厚唇裸重唇鱼的遗传结构和系统发育还需开发其微卫星标记。但厚唇裸重唇鱼作为多倍体类群，目前对多倍体等位基因的确切精确性不足，大部分研究都是通过等位基因的剂量差异法来确定，存在一定误差 (Julier et al. 2010, Hou et al. 2013, 杨月静 2019)。且用于分析微卫星位点数据的生物学软件也主要针对二倍体物种开发，用于多倍体物种分析的软件较少，一些遗传多样性参数如多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、有效等位基因数 (effective number of allele, N_e) 等也缺乏用于多倍体生物的分析软件，这就给厚唇裸重唇鱼的微卫星位点开发带来了困难。在裸重唇鱼属，仅赵雪飞等 (2019) 基于扁吻鱼 (*Aspiorhynchus laticeps*) 微卫星引物筛选获得 4 个微卫星标记用于新疆裸重唇鱼 (*G. dybowski*) 的遗传多样性分析。

本研究对厚唇裸重唇鱼基因组进行

Illumina HiSeq 高通量测序，筛选得到 15 个微卫星位点，并采用雅砻江和黄河水系的种群对其多态性进行了分析，以期为这一珍稀鱼类的种群遗传学研究提供适合的分子标记。

1 材料与方法

1.1 样本采集和基因组提取

2014 至 2016 年，从黄河支流渭河麦积区社棠镇河段采集 24 尾厚唇裸重唇鱼渭河亚种 (*G. p. weiheensis*)，2020 至 2022 年，从雅砻江干流中游新龙县和平乡、共科乡河段采集 32 尾厚唇裸重唇鱼指名亚种 (*G. p. pachycheilus*) (图 1)，取采集样本的部分胸鳍保存于无水乙醇中。使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Marine Animals DNA Kit, TIANGEN) 提取基因组 DNA，经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 质量检测后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存。

1.2 高通量测序、微卫星搜索和引物合成

选取 15 尾新龙样本和 5 尾渭河样本基因组 DNA 混合为模板，使用 Hiseq2000 测序仪

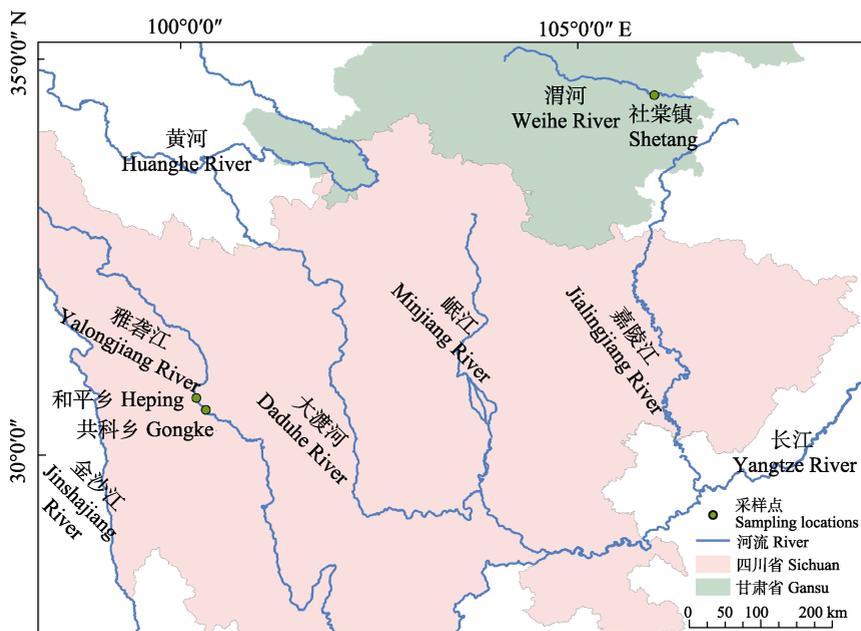


图 1 厚唇裸重唇鱼采样点

Fig. 1 The sampling locations of *Gymnoditychus pachycheilus*

(Illumina, USA) 对基因组 DNA 进行高通量测序(上海派森诺生物科技有限公司提供): 采用磁珠富集法分离基因组文库中含微卫星的 DNA 片段, 构建微卫星标记富集文库后进行双端测序, 测序数据经 FastQC (v0.11.7) 进行数据质控 (Bolger et al. 2014)。经 fastp (v0.20.0) 过滤接头、低质量序列后使用微卫星识别工具 MISA 搜索微卫星位点, 使用软件 Premier 5.0 基于重复单元侧翼序列设计扩增引物 (Li et al. 2013)。

1.3 PCR 扩增及产物检测

随机选取 6 尾厚唇裸重唇鱼的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 采用 25 μ l 反应体系: 1 μ l 基因组 DNA (50 mg/L), 13.5 μ l 2 \times TSINGKE Master Mix, 0.5 μ l 正、反向引物 (10 μ mol/L), 9.5 μ l 灭菌水。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 48 ~ 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 12 min (120 V 电压, 400 mA 电流)。选取扩增条带清晰且单一的引物, 在 5' 端增加 FAM、HEX 或 TAMRA 荧光标记 (引物由北京擎科生物技术有限公司合成), 对两个种群的基因组 DNA 进行扩增, 将扩增产物送北京擎科生物技术有限公司经毛细管电泳进行等位基因分型。

1.4 数据分析

厚唇裸重唇鱼毛细管电泳分型结果显示, 每一位点最多同时出现 4 个峰值, 且已有研究报道裂腹鱼基因组多为四倍体 (Hou et al. 2013, 杨月静 2019, Ma et al. 2020), 因此我们进行等位基因读数时采用普遍用于判断四倍体的剂量差异法 (侯飞侠 2013)。使用软件 MICRO-CHECKER v2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) 对分型结果进行检查, 排除基因分型错误或人为读数误差, 再使用四倍体基因型数据分析软件 Autotet (Thrall et al. 2000) 计算微卫星遗传多样性, 包括平均等位基因数 (average number of alleles, A)、平均等位基因丰富度 (average allelic richness, A_1)、观测杂合度

(observed heterozygosity, H_o)、染色体随机分离情况下的期望杂合度 (under random chromosome segregation, average expected heterozygosity, $H_{e(Ce)}$)、染色单体随机分离情况下的期望杂合度 (under some level of chromatid segregation, average expected heterozygosity, $H_{e(Cd)}$)。利用 Genepop version 4.7.5 (Raymond et al. 1995) 检测位点的哈迪温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 和连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD), 并采用 Bonferroni 校正。使用 PIC_Calc0.6 软件 (https://github.com/luansheng/PIC_CALC) 计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。

2 结果

2.1 高通量测序结果与微卫星位点分析

Illumina HiSeq 测序共获得 2.002 G Rawdata, GC 含量为 39%, Q30 为 91.07%。经搜索后获得 85 905 条序列包含 1 个以上微卫星位点, 567 200 个 1 ~ 6 碱基重复微卫星位点, 其中 2 碱基重复位点 300 639 个, 占总位点数的 53%, 单碱基重复位点 181 398 个, 占 31.98%, 3、4、5、6 碱基重复位点占比依次为 7.12%、6.84%、0.55% 和 0.51%。

2.2 微卫星位点筛选

共选择并设计了 70 对微卫星引物, 包括 21 个 2 碱基重复, 24 个 3 碱基重复和 25 个 4 碱基重复类型的微卫星标记。PCR 产物经琼脂糖电泳和毛细管电泳检测分型后, 获得 15 对可扩增出目的条带且产物具多态性的引物 (表 1)。

2.3 微卫星位点多态性评估

新龙种群中 (表 2), 15 个位点共扩增出 103 个等位基因, 每位点产生的等位基因数为 3 ~ 13, 平均等位基因数 (A) 为 6.9。观测杂合度 (H_o) 变化范围为 0.226 ~ 0.989 (平均值 0.712 4); 染色体随机分离下的期望杂合度 ($H_{e(Ce)}$) 变化范围为 0.382 ~ 0.837 (平均值 0.681 7), 染色单体随机分离下的期望杂合度 ($H_{e(Cd)}$) 变化范围为 0.356 ~ 0.781 (平均值

表 1 厚唇裸重唇鱼微卫星位点信息

Table 1 Primer sequences and characteristics of microsatellite loci of *Gymnodiptychus pachycheilus*

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	重复碱基及 重复数量 Repeat motif	退火温度 Annealing Temperature T_m (°C)	产物长度 Product length (bp)
GP1	F: AAGAAAGGGTTCATGTGGT R: TGCCTTTGTATGGGACCTCT	(ATCT)10	64	198 - 222
GP2	F: CAGGCTGGATTTCTAGCTGC R: AGGGGTCGGATGCTTTTAGT	(ATT)13	56	216 - 228
GP3	F: TGTCTGTCTCTGTTGCTGTC R: GTGGAATAAGGATGCCGTCT	(GATA)15	62	174 - 236
GP4	F: TTGCCCAAATGTTGGTTACA R: GGTCTGCTATTGAACCTTGA	(TTTC)14	56	190 - 230
GP5	F: GGTGTAGTGCAAAGAGCTTATCAA R: AGTGGCAAAACTGAACCCAGC	(TAA)9	56	262 - 289
GP6	F: TTGATGTTTTGGCAATGTTGT R: TTGTGGGGAATTGTGAGTGA	(GTTT)15	57	246 - 294
GP7	F: GGAAACCAATTAGACCTTTCCC R: CACATGCTCTGGTTGCATCT	(AT)15	60	118 - 146
GP8	F: GCAGCCACTTGGAAGCTCT R: GCCCAGTTCATTACCTCAA	(ATG)8	62	160 - 181
GP9	F: TGCATTCTACTTTCCCCCA R: AATAAATGTGCCCTGTGCC	(CA)20	54	268 - 300
GP10	F: CAGACTTTTCTTGTCTTCTAGGG R: CGATTGCCTCAGCAGTTA	(AAT)8	53	300 - 312
GP11	F: TGTGGGCTGAATCTAAAGCA R: TGAGCAGGGACTGAAAAAGA	(AC)10	54	270 - 296
GP13	F: GTTGGCTTGAGGAAGCCTTA R: CATTACCTCACACCTCTGAACCTC	(TAGA)20	63	200 - 240
GP14	F: GTGGCTTTGCACCTGGTTCT R: TCTCGCTCGTGCATATTGC	(TA)24	57	220 - 252
GP16	F: GTTAACCTGGAGGGCAAACA R: CTGGATGCATACTTGTCCGTA	(TCTT)8	60	192 - 238
GP17	F: CGTTCAGCTCCAGGTTTCTC R: TTTGGCCAGAGAGGTCTGAT	(GTT)11	59	223 - 244

0.636 3)。多态信息含量 (PIC) 为 0.358 4 ~ 0.815 5 (平均值 0.630 3)。经 Bonferroni 校正后 (矫正 P 值 0.001 6), 15 个微卫星位点中有 8 个位点 (GP1、GP2、GP5、GP7、GP8、GP14、GP16、GP17) 显著偏离哈迪-温伯格平衡, 除去位点 GP1 与 GP14 外, 其余位点间不存在连锁。

在渭河亚种种群中 (表 3), 15 个位点共扩增出 126 个等位基因, 每位点产生的等位基因数为 4 ~ 16, 平均等位基因数 (A) 为 8.4。观测杂合度 (H_o) 变化范围为 0.444 ~ 0.868 (平均值 0.719 5); 染色体随机分离下的期望杂合

度 ($H_{e(c_e)}$) 变化范围为 0.539 ~ 0.872 (平均值 0.725 8), 染色单体随机分离下的期望杂合度 ($H_{e(C_d)}$) 变化范围为 0.503 ~ 0.813 (平均值 0.677 3)。多态信息含量 (PIC) 为 0.432 8 ~ 0.860 4 (平均值 0.680 7)。经 Bonferroni 校正后 (矫正 P 值 0.002 1), 15 个微卫星位点中有 7 个位点 (GP1、GP6、GP10、GP11、GP14、GP16、GP17) 显著偏离了哈迪-温伯格平衡, 除去位点 GP4 与 GP7、GP7 与 GP9、GP7 与 GP11、GP16 与 GP17 外, 其余位点间不存在连锁。

表 2 厚唇裸重唇鱼 15 个微卫星位点在雅砻江种群中的多态性特征

Table 2 Characteristics of 15 microsatellite markers in *Gymnodiptychus pachycheilus* *pachycheilus* from the Yalongjiang River

位点 Locus	样本数 Sample size	A	A _i	H _o	H _{e(c_e)}	H _{e(c_d)}	PIC	P 值 P value
GP1	32	3	1.387	0.226	0.608	0.568	0.535 5	< 0.000 1
GP2	32	3	2.968	0.828	0.625	0.583	0.554 5	< 0.000 1
GP3	32	6	3.000	0.806	0.722	0.674	0.676 5	0.135 2
GP4	32	12	3.097	0.833	0.818	0.763	0.794 1	0.670 8
GP5	32	5	3.097	0.849	0.689	0.643	0.637 2	< 0.000 1
GP6	32	9	2.935	0.785	0.837	0.781	0.815 5	0.771 7
GP7	32	9	3.935	0.989	0.808	0.754	0.780 0	< 0.000 1
GP8	32	8	2.710	0.753	0.644	0.601	0.601 5	< 0.000 1
GP9	32	12	3.065	0.844	0.806	0.752	0.784 1	0.368 6
GP10	32	3	2.290	0.640	0.649	0.606	0.575 3	0.908 4
GP11	32	7	2.581	0.747	0.722	0.674	0.677 5	0.954 9
GP13	32	13	2.839	0.790	0.753	0.703	0.723 6	0.991 2
GP14	32	7	1.548	0.301	0.489	0.456	0.449 7	< 0.000 1
GP16	32	3	2.032	0.634	0.514	0.480	0.404 4	0.000 2
GP17	32	3	2.129	0.661	0.542	0.506	0.444 4	< 0.000 1
平均值 Average value	32	6.87	2.640 9	0.712 4	0.681 7	0.636 3	0.630 3	

A. 平均等位基因数; A_i. 平均等位基因丰富度; H_o. 观测杂合度; H_{e(c_e)}. 染色体随机分离情况下的期望杂合度; H_{e(c_d)}. 染色单体随机分离情况下的期望杂合度; PIC. 多态信息含量。

A. Average number of alleles; A_i. Average allelic richness; H_o. Observed heterozygosity; H_{e(c_e)}. Under random chromosome segregation, average expected heterozygosity; H_{e(c_d)}. Under some level of chromatid segregation, average expected heterozygosity; PIC. Polymorphism information content.

3 讨论

Kalinowski (2005) 和 Schlotterer (2004) 认为, 基因组中微卫星位点的重复单元长度与其在整个基因组序列中的比例呈负相关趋势, 在大部分物种中 2 碱基重复类型的微卫星占比最高。在鱼类中, Lei 等 (2021) 通过对 14 种鱼类的全基因组特征分析发现, 其中 11 种鱼类微卫星以 2 碱基重复模式为主。此外, 在长体圆鲩 (*Decapterus macrosoma*) (孔啸兰等 2019)、理县高原鳅 (*Triplophysa lixianensis*) (马青展 2020)、安水金线鲃 (*Sinocyclocheilus*

anshuiensis) 等 (王军等 2019) 全基因组微卫星分析中也得出同样结论。厚唇裸重唇鱼基因组中 2 碱基重复微卫星位点数量最多, 6 碱基重复最少, 这与其他鱼类一致。大量研究表明 (Kalinowski 2005, Hoffman et al. 2009, 马青展 2020), 相比 2 碱基重复类型, 3、4 碱基重复类型的微卫星位点发生滑带及等位基因丢失现象更少, 因此在 PCR 产物分型时等位基因差距更明显, 且杂峰更少, 不易产生错误读数。在筛选厚唇裸重唇鱼微卫星位点时, 优先选择了 3、4 碱基重复类型的微卫星位点, 其分型效果好, 保证了高质量位点的获取。

表 3 厚唇裸重唇鱼 15 个微卫星位点在渭河种群中的多态性特征

Table 3 Characteristics of 15 microsatellite markers in *Gymnodiptychus pachycheilus weiheensis* from the Weihe River

位点 Locus	样本数 Sample size	A	A_i	H_o	$H_{e(c_e)}$	$H_{e(c_d)}$	PIC	P 值 P value
GP1	24	7	2.292	0.562	0.656	0.612	0.604 0	0.002 2
GP2	24	5	2.833	0.792	0.701	0.654	0.645 9	0.592 0
GP3	24	6	2.792	0.757	0.643	0.600	0.587 3	0.705 2
GP4	24	14	2.667	0.757	0.853	0.796	0.838 4	< 0.000 1
GP5	24	5	2.833	0.785	0.713	0.665	0.662 8	0.906 2
GP6	24	10	2.750	0.757	0.829	0.774	0.811 6	0.018 4
GP7	24	10	2.458	0.743	0.768	0.717	0.736 9	< 0.000 1
GP8	24	8	3.083	0.847	0.779	0.727	0.744 5	0.962 9
GP9	24	16	3.208	0.868	0.872	0.813	0.860 4	0.114 4
GP10	24	4	1.958	0.444	0.690	0.644	0.635 1	0.000 2
GP11	24	8	2.125	0.542	0.679	0.634	0.633 0	< 0.000 1
GP13	24	10	3.292	0.868	0.831	0.776	0.812 3	0.021 1
GP14	24	14	2.417	0.715	0.795	0.742	0.772 1	< 0.000 1
GP16	24	4	2.042	0.674	0.539	0.503	0.432 8	< 0.000 1
GP17	24	5	2.083	0.681	0.539	0.503	0.433 6	< 0.000 1
平均值 Average value	24	8.4	2.588 9	0.719 5	0.725 8	0.677 3	0.680 7	

A. 平均等位基因数; A_i . 平均等位基因丰富度; H_o . 观测杂合度; $H_{e(c_e)}$. 染色体随机分离情况下的期望杂合度; $H_{e(c_d)}$. 染色单体随机分离情况下的期望杂合度; PIC. 多态信息含量。

A. Average number of alleles; A_i . Average allelic richness; H_o . Observed heterozygosity; $H_{e(c_e)}$. Under random chromosome segregation, average expected heterozygosity; $H_{e(c_d)}$. Under some level of chromatid segregation, average expected heterozygosity; PIC. Polymorphism information content.

多态信息含量是衡量遗传片段多态性的一个重要参数。Botstein 等 (1980) 提出的基因变异速率与 PIC 值关系显示, 当 PIC 值处于 0~0.25 之间时, 该位点为低多态性位点; 当 PIC 值处于 0.25~0.50 时, 该位点为中等程度多态性位点; 当 PIC 值达到 0.50 以上时, 该位点为高多态性位点。群体的 PIC 值与基因的杂合度呈正相关关系, PIC 值越高, 提供的遗传信息越丰富。本研究筛选的 15 个位点大多数具有高的多态性, 在雅砻江种群中检测表明, 12 个为高多态性位点 (PIC 值 0.535 5~0.815 5), 3 个为中度多态性位点 (PIC 值 0.404 4~0.449 7); 在渭河种群中, 13 个为高多态性位点 (PIC 值

0.587 3~0.860 4), 2 个位点为中度多态性位点 (PIC 值 0.432 8~0.433 6), 这些位点适用于厚唇裸重唇鱼的种群遗传学等研究。

在理想状态下, 若每个等位基因的频率在遗传过程中保持稳定, 则认为群体已达到哈迪-温伯格平衡, 但同源四倍体物种比二倍体物种更易偏离哈迪-温伯格平衡的现象已被很多研究者证实 (Sardaro et al. 2008, González-Pérez et al. 2009, Kevin et al. 2009, 侯飞侠 2013)。本研究筛选的微卫星中有较多位点偏离平衡, 主要有以下原因: (1) 四倍体物种需要繁殖很多代后才可达到哈迪-温伯格平衡, 所以较二倍体物种更易偏离平衡; (2) 非随机交配和近交

(马青展 2020); (3) 时间推移导致的种群基因频率变化 (Jin et al. 2022) 和华伦德效应 (Wahlund effect) (Liu et al. 2017)。新龙样本于 2020 至 2022 年采自雅砻江新龙县和平乡和共科乡两个采样点, 渭河样本于 2014 至 2016 年采自渭河麦积区社棠镇河段, 不同年份和不同地理种群中的基因频率差异可能会导致哈迪温伯格平衡的偏离; (4) 瓶颈效应, 在种群经历进化瓶颈效应后, 等位基因数量和杂合度将减少, 其中等位基因缺失比杂合度减少更快, 导致杂合度过高, 表现出显著的杂合度过剩 (heterozygote excess) (Sepúlveda et al. 2017)。在新龙种群, 8 个偏离哈迪-温伯格平衡的位点中 6 个表现为杂合子过剩。在同属裂腹鱼亚科的大渡裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis chengi*) (Hou et al. 2013) 和齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) (杨月静 2019) 中均发现大量的微卫星位点偏离了哈温平衡, 作为多倍体中较普遍的现象, 并未显著影响其用于种群遗传多样性、遗传结构等检测分析。基于此, 我们认为筛选获得的 15 个微卫星位点适合用于厚唇裸重唇鱼种群遗传学研究。

遗传多样性是种群的重要特性, 对生物的生存和演化极其重要。作为生物进化的动力, 生物会产生不同的基因类型来适应环境的变化, 等位基因数、多态信息含量和杂合度

等均能反映群体遗传多样性水平。本研究中平均等位基因数、观测杂合度和多态信息含量新龙种群分别为 6.87、0.712 4、0.630 3, 渭河种群分别为 8.40、0.719 5、0.680 7, 与同亚科的青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalski*, 蒋鹏等 2009)、松潘裸鲤 (*G. potanini*, 周宇 2018)、软刺裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis malacanthus*, 同琳钿 2022)、大渡裸裂尻鱼 (侯飞侠 2013)、扁吻鱼 (*Aspiorhynchus laticeps*, 郝卓然等 2012) (表 4) 相比, 厚唇裸重唇鱼遗传多样性处于中等偏低水平, 且雅砻江新龙种群低于渭河亚种群。有证据表明, 分布于青藏高原周边地区小生境内的裂腹鱼种群可能是一些冰期后的残余个体经过扩张形成的, 因此作为较小的奠基种群, 其遗传多样性是极为有限的 (Ma et al. 2020), 同时由于末次冰期冰川的影响, 冰下更低的环境以及流水生境的减少导致雅砻江干流中上游缺乏厚唇裸重唇鱼适宜的生存条件 (Wang et al. 2022)。此外, 栖息地的生境条件会对鱼类遗传多样性模式产生影响, 雅砻江中游受到的人为干扰强度相对较大, 水利工程建设导致的河流生境破碎化以及水体污染、过度捕捞、河道挖沙等人类活动的影响 (梅朋森等 2009), 威胁着本土鱼类的生存繁衍, 不利于其遗传多样性的积累。

表 4 裂腹鱼亚科其他鱼类微卫星遗传多样性统计

Table 4 Statistics of microsatellite genetic diversity of other Schizothoracinae fish species

物种 Species	平均等位基因数 Average number of alleles	观测杂合度 Observed heterozygosity	多态信息含量 Polymorphism information content	数据来源 Reference
青海湖裸鲤 <i>Gymnocypris przewalski</i>	1.92 - 2.17	0.414 5 - 0.510 5	0.364 2 - 0.407 4	蒋鹏等 2009
松潘裸鲤 <i>G. potanini</i>	18	0.698	0.801	周宇 2018
软刺裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis malacanthus</i>	28.58	0.773	0.901 22	同琳钿 2022
大渡裸裂尻鱼 <i>S. chengi chengi</i>	16.364	0.701	0.897	侯飞侠 2013
宝兴裸裂尻鱼 <i>S. chengi baoxingensis</i>	8.25	0.54		侯飞侠 2013
扁吻鱼 <i>Aspiorhynchus laticeps</i>	3.54	0.530 6	0.535 3	郝卓然等 2012

参 考 文 献

- Bolger A M, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314.
- Fernández-Pérez J, Nantón A, Arias-Pérez A, et al. 2019. Fifteen novel microsatellite loci, developed using next-generation sequencing, reveal the lack of genetic structure in *Donax vittatus* from Iberian Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 21(7): 218–225.
- González-Pérez M A, Lledó M D, Lexer C, et al. 2009. Genetic diversity and differentiation in natural and reintroduced populations of *Bencomia exstipulata* and comparisons with *B. caudate* (Rosaceae) in the Canary Islands: an analysis using microsatellites. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160(4): 429–441.
- Hoffman J I, Dasmahapatra K K, Amos W, et al. 2009. Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation. *Molecular Ecology*, 18(14): 2961–2978.
- Hou F X, Zhang H B, Zhang X Y, et al. 2013. Characterization of microsatellite loci in *Schizopygopsis chengi chengi* and their utilization in assessment of the genetic diversity in *Schizopygopsis chengi baoxingensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46(1): 50–54.
- Jin Y J, He K, Xiang P, et al. 2022. Temporal genetic variation of the Chinese Longsnout Catfish (*Leiocassis longirostris*) in the upper Yangtze River with resource decline. *Environmental Biology of Fishes*, 12(1): 1–13.
- Julier B, Semiani Y, Laour M. 2010. Genetic diversity in a collection of Lucerne populations from the Mediterranean Basin evaluated by SSR markers. *Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*, 14(1): 107–112.
- Kalinowski S T. 2005. hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5(1): 187–189.
- Kevin K S, Lee S L, Ueno S. 2009. Impact of selective logging on genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems using direct comparison and simulation methods. *Forest Ecology and Management*, 25(7): 107–116.
- Lei Y, Zhou Y, Price M, et al. 2021. Genome-wide characterization of microsatellite DNA in fishes: survey and analysis of their abundance and frequency in genome-specific regions. *BMC Genomics*, 22(1): 1–22.
- Li W, Pan L, Que Y, et al. 2013. Isolation and characterization of 11 microsatellite loci in *Schizothorax wangchiachii* (Fang). *Conservation Genetics Resources*, 5(1): 271–273.
- Liu B J, Zhang B D, Gao T X, et al. 2017. Signatures of temporal genetic differentiation of the Small Yellow Croaker (*Larimichthys polyactis*) revealed by microsatellite markers. *Fisheries Research*, 19(4): 50–54.
- Ma Q, He K, Wang X, et al. 2020. Better resolution for cytochrome b than cytochrome c oxidase subunit I to identify *Schizothorax* species (Teleostei: Cyprinidae) from the Tibetan Plateau and its adjacent area. *DNA and Cell Biology*, 39(4): 579–598.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 68(3): 248–249.
- Razak S A, Ezzah H, Azman N, et al. 2019. Assessment of diversity and population structure of mango (*Mangifera indica* L.) germplasm based on microsatellite (SSR) markers. *Australian Journal of Crop Science*, 13(2): 315–320.
- Sardaro M L S, Atallah M, Tavakol E, et al. 2008. Diversity for AFLP and SSR in natural populations of *Lotus corniculatus* L. from Italy. *Crop Science Society of America*, 48(3): 1080–1089.
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5(1): 63–69.
- Sepúlveda F A, González M T. 2017. Spatio-temporal patterns of genetic variations in populations of Yellowtail Kingfish *Seriola lalandi* from the south-eastern Pacific Ocean and potential implications for its fishery management. *Journal of Fish Biology*, 90(1): 249–264.
- Su J H, Wei H. 2014. Genetic structure and demographic history of the endangered and endemic schizothoracine fish *Gymnodiptychus pachycheilus* in Qinghai-Tibetan Plateau.

- Zoological Science, 31(8): 515–522.
- Sun P, Tang B J. 2018. Low mtDNA variation and shallow population structure of the Chinese pomfret *Pampus chinensis* along the China coast. *Journal of Fish Biology*, 11(3): 125–130.
- Thrall P H, Young A. 2000. Computer note. AUTOTET: a program for analysis of Autotetraploid genotypic data. *Journal of Heredity*, 91(4): 348–349.
- van Oosterhout C, Hutchinson W F, Wills D P M, et al. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 535–538.
- Wang X, Tong L, Deng J, et al. 2022. Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of *Schizopygopsis malacanthus* Herzenstein (Cypriniformes, Cyprinidae) across the upper and middle Yalong River drainage in the Hengduan Mountains region, southwest China. *Global Ecology and Conservation*, 35(1): e02084.
- 丁瑞华. 1994. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 391–393.
- 杜岩岩, 史小宁, 宋福俊, 等. 2016. 黄河上游甘肃段厚唇裸重唇鱼资源分布现状调查. *甘肃畜牧兽医*, 46(15): 124–126.
- 郝卓然, 梁利群, 常玉梅, 等. 2012. 扁吻鱼微卫星的筛选及群体多样性分析. *水产学杂志*, 25(3): 20–25.
- 何德奎, 陈毅峰. 2007. 高度特化等级裂腹鱼类分子系统发育与生物地理学. *科学通报*, 52(3): 303–312.
- 侯飞侠. 2013. 大渡裸裂尻鱼和软刺裸裂尻鱼的遗传多样性及种群结构研究. 成都: 四川大学博士学位论文, 21–42.
- 蒋红, 谢嗣光, 赵文谦, 等. 2007. 二滩水电站水库形成后鱼类种类组成的演变. *水生生物学报*, 21(4): 532–539.
- 蒋鹏, 史健全, 张研, 等. 2009. 应用微卫星多态分析青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalski* (Kessler)) 六个野生群体的遗传多样性. *生态学报*, 29(2): 939–945.
- 蒋志刚. 2021. 中国脊椎动物红色名录. 北京: 科学出版社, 537–540.
- 孔啸兰, 李敏, 陈作志, 等. 2019. 基于 RAD-seq 技术的长体圆鯮二、三核苷酸重复微卫星标记开发与评价. *南方水产科学*, 15(3): 97–103.
- 李柯懋, 高桂香. 2012. 厚唇裸重唇鱼生物学特性及保护建议. *河北渔业*, (6): 18–19, 25.
- 马青展. 2020. 高原鳅属鱼类亲缘地理学及遗传多样性研究. 成都: 四川大学博士学位论文, 91–108.
- 梅朋森, 王力, 韩京成, 等. 2009. 水电开发对雅砻江流域生态环境的影响. *三峡大学学报: 自然科学版*, 31(2): 8–12.
- 同琳钰. 2022. 雅砻江水系软刺裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis malacanthus*) 遗传多样性和亲缘地理学研究. 成都: 四川大学硕士学位论文, 31–38.
- 王军, 罗琦, 段茜. 2019. 3 种金线鲃属鱼类基因组微卫星的筛选与分析. *贵州师范大学学报: 自然科学版*, 37(4): 19–24.
- 杨月静. 2019. 齐口裂腹鱼分子标记的开发及群体遗传多样性研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 20–23.
- 张艳萍, 杜岩岩, 虎永彪, 等. 2013. 厚唇裸重唇鱼渭河亚种分类地位的探讨. *动物分类学报*, 38(4): 705–713.
- 赵雪飞, 米博翰, 梁利群, 等. 2019. 新疆裸重唇鱼和斑重唇鱼遗传多样性分析. *水产学杂志*, 32(2): 19–24.
- 中国林业和草原局, 中国农业农村部. 2021. 国家重点保护野生动物名录. *野生动物学报*, 42(2): 605–640.
- 周宇. 2018. 松潘裸鲤 (*Gymnocypris potanin*) 种群遗传学研究. 成都: 四川大学硕士学位论文, 50–58.