

基于高通量测序的三种裂腹鱼微卫星引物筛选及其在遗传多样性分析中的应用

杜岩岩^{①②} 杨濯羽^{①②} 宋福俊^{①②} 苏子郡^{①②}

史小宁^{①②} 张艳萍^{①②} 王太^{①②*}

① 甘肃省水产研究所/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;

② 甘肃省水产研究所/甘肃省黄河上游渔业资源环境野外科学观测研究站 临夏 731100

摘要: 为了解祁连裸鲤 (*Gymnocypris chilianensis*)、黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*) 和嘉陵裸裂尻鱼 (*S. kialingensis*) 3 种高原裂腹鱼类不同群体间遗传分化程度和遗传多样性, 采用高通量测序技术对 3 种裂腹鱼基因组进行随机测序, 筛选出微卫星位点设计引物, 通过毛细管荧光电泳分型筛选出 21 对多态性较高的 3 个物种通用引物。利用 21 对通用引物对 16 个群体 309 尾个体的基因组 DNA 进行扩增, 其中, 祁连裸鲤 5 个群体 110 尾个体, 黄河裸裂尻鱼 6 个群体 72 尾个体, 嘉陵裸裂尻鱼 5 个群体 127 尾个体。祁连裸鲤黄羊群体遗传多样性最高(等位基因数 N_a 为 1.442, 有效等位基因数 N_e 为 1.314, 香浓指数 I 为 0.203, Nei's 基因多样性指数 h 为 0.203, 多态位点百分率 P 为 44.24%), 张掖群体最低 (N_a 1.042, N_e 1.042, I 0.029, h 0.021, P 4.24%); 黄河裸裂尻鱼祁连群体遗传多样性最高 (N_a 1.539, N_e 1.193, I 0.206, h 0.127, P 53.94%), 石门群体最低 (N_a 1.236, N_e 1.126, I 0.120, h 0.078, P 23.64%); 嘉陵裸裂尻鱼石门群体遗传多样性最高 (N_a 1.351, N_e 1.152, I 0.147, h 0.094, P 35.15%), 舟曲群体最低 (N_a 1.181, N_e 1.089, I 0.088, h 0.057, P 18.18%)。总体来看, 黄河裸裂尻鱼的遗传多样性高于祁连裸鲤和嘉陵裸裂尻鱼。不同种内各群体间遗传参数差异相对较小, 表明各群体间遗传多样性水平相近。贝叶斯基因型聚类分析显示, 黄河裸裂尻鱼(黄羊群体)和祁连裸鲤(黄羊群体)之间、黄河裸裂尻鱼(石门群体)和嘉陵裸裂尻鱼(石门群体)之间存在种间基因渐渗现象。研究筛选出的微卫星位点多态性较高, 对 3 种裂腹鱼 16 个群体的遗传多样性进行评价, 可以有效评估其种质资源状况, 为裂腹鱼类资源保护提供遗传数据依据。

关键词: 裂腹鱼; 祁连裸鲤; 黄河裸裂尻鱼; 嘉陵裸裂尻鱼; 地理群体; 遗传分化

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 03-414-13

基金项目 甘肃省自然科学基金项目 (No. 23JRRA1334), 甘肃省创新基地和人才计划项目 (No. 21JR7RA720), 农业农村部财政专项项目 (No. HHDC202302);

* 通讯作者, E-mail: 5279292@qq.com;

第一作者介绍 杜岩岩, 女, 正高级工程师; 研究方向: 鱼类资源保护; E-mail: 273639273@qq.com。

收稿日期: 2024-09-27, 修回日期: 2024-11-28 DOI: 10.13859/j.cjz.202524219 CSTR: 32109.14.cjz.24219

Microsatellite Loci Isolation for Three Schizothoracine Species and Their Applications on Analysis of Genetic Polymorphism

DU Yan-Yan^{①②} YANG Zhuo-Yu^{①②} SONG Fu-Jun^{①②} SU Zi-Jun^{①②}
SHI Xiao-Ning^{①②} ZHANG Yan-Ping^{①②} WANG Tai^{①②*}

① Gansu Key Laboratory of Cold Water Fishes Germplasm Resources and Genetics Breeding, Gansu Fisheries Research Institute, Lanzhou 730030; ② Gansu Fishery Resources and Environment in the Upper Reaches of the Yellow River Observation and Research Station, Gansu Fisheries Research Institute, Linxia 731100, China

Abstract: [Objectives] To investigate the genetic diversity and differentiation among populations of *Gymnocypris chilianensis*, *Schizopygopsis pylzovi*, and *S. kialingensis* distributed in Gansu Province, microsatellite markers were screened and used to assess the conservation genetics of these three species. **[Methods]** From 2017 to 2022, 309 ind from 16 populations of the three fish species were collected from the Weihe, Taohe, and Daxia Rivers (Yellow River basin); the Bailongjiang River (Jialing River in the Yangtze Valley); and the Shule, Heihe, and Shiyang Rivers (inland river systems). These included 110 ind from 5 populations of *G. chilianensis*, 72 ind from 6 populations of *S. pylzovi*, and 127 ind from 5 populations of *S. kialingensis*. High-throughput sequencing was conducted to identify microsatellite markers in the three species. Polymorphism at microsatellite loci was assessed using samples from the Schizothoracine species, and microsatellite polymorphism was detected by capillary fluorescence electrophoresis. GeneMaker 2.2.0 was used to read the capillary electrophoresis test results. Data were calibrated according to the base repeat unit at each SSR site to obtain genotyping data. Genetic diversity statistics were calculated using PopGene 1.32, including number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Shannon's index (I), Nei's gene diversity (h), and percentage of polymorphic loci (P). Bayesian clustering analysis was performed using Structure software, with the length of the burn-in period parameter and the number of MCMC repeated sampling set to 1×10^5 and 1×10^6 , respectively. The K values for the clustering group were set to 1 - 17, with each K value calculated 10 times. A UPGMA dendrogram was generated using Mega 7, with the bootstrap value set at 1 000. **[Results]** Capillary fluorescence electrophoresis identified 21 highly polymorphic primer pairs suitable for three species (Table 2). These 21 universal primer pairs were used to amplify 309 ind from 16 populations. Among the *G. chilianensis* populations, Huangyang population showed the highest genetic diversity (N_a 1.442, N_e 1.314, I 0.203, h 0.203, P 44.24%), while Zhangye population had the lowest (N_a 1.042, N_e 1.042, I 0.029, h 0.021, P 4.24%). For *S. pylzovi*, Qilian population had the highest genetic diversity (N_a 1.539, N_e 1.193, I 0.206, h 0.127, P 53.94%), and Shimen population the lowest (N_a 1.236, N_e 1.126, I 0.120, h 0.078, P 23.64%). *S. kialingensis* showed the highest genetic diversity in the Shimen population (N_a 1.351, N_e 1.152, I 0.147, h 0.094, P 35.15%), with the lowest in the Zhouqu population (N_a 1.181, N_e 1.089, I 0.088, h 0.057, P 18.18%) (Table 3). Overall, *S. pylzovi* exhibited higher genetic diversity than *G. chilianensis* and *S. kialingensis*. Genetic parameters indicated little intraspecific variation across different populations within species, suggesting comparable genetic diversity levels among populations. Bayesian genotype clustering detected interspecies gene flow between *S. pylzovi* and *G. chilianensis* in the

Huangyang population, and between *S. pylzovi* and *S. kialingensis* in the Shimen population (Fig. 4). A UPGMA dendrogram of 16 Schizothoracine populations based on Nei's genetic distance showed that *S. pylzovi* and *S. kialingensis* populations formed small branches before clustering into a larger branch. The Shiyang population of *S. pylzovi* and all *G. chilianensis* populations formed one distinct branch (Fig. 5). [Conclusion] The genetic diversity of 16 populations across three Schizothoracine species was evaluated, thereby providing valuable insights into their germplasm status and supporting future conservation strategies.

Key words: Schizothoracine; *Gymnocypris chilianensis*; *Schizopygopsis pylzovi*; *S. kialingensis*; Genetic differentiation; Geographic group

祁连裸鲤 (*Gymnocypris chilianensis*)、黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*)、嘉陵裸裂尻鱼 (*S. kialingensis*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae), 分别属于裸鲤属和裸裂尻鱼属, 均为高度特化等级的裂腹鱼类 (王香亭 1991, 乐佩琦 2000, 何德奎等 2007)。祁连裸鲤仅分布在河西地区疏勒河、黑河、石羊河等内陆河水系 (李思忠等 1974, 杨友桃等 1991)。嘉陵裸裂尻鱼主要分布在嘉陵江上游支流白龙江 (伍献文 1964, 王香亭 1991, 王太等 2017), 在甘肃渭源县渭河流域石门水库也采集到。黄河裸裂尻鱼是分布较广泛的高原裂腹鱼类, 自黄河兰州以上河段的干支流及湖泊, 以及内陆河水系均有分布 (唐文家 2008)。裂腹鱼类都具有生长缓慢、性成熟晚及繁殖力低的特点 (马宝珊等 2023), 加上水电开发、水体污染以及过度捕捞等人类活动影响, 许多裂腹鱼类种群数量减少且分布范围缩减, 同时, 拦河筑坝阻隔了上下游种群间的基因交流, 因此进行遗传多样性评估对其资源保护有重要意义。

目前关于以上 3 种裂腹鱼的分子标记研究主要集中在在线粒体基因组 (Wang et al. 2016)、线粒体 DNA Cyt *b* (赵凯等 2006, Zhao et al. 2011, 娄晋铭等 2019)、线粒体 DNA 控制区 (祁得林等 2008, 王太等 2017) 及线粒体 DNA 其他基因 (晁燕等 2011)。但由于线粒体基因是母系遗传, 用于分析遗传多样性不够全面, 需要开发微卫星等核基因标记来补充

相关研究。虽然微卫星标记 (Microsatellite) 有数量多、多态性高、变异性强、灵敏度高且操作简便等突出优点, 并且已经被广泛应用到水生动物亲子鉴定 (何勇凤等 2019, 李兰兰等 2021)、增殖放流效果评估 (冯晓婷等 2019)、种群遗传多样性分析 (黄承勤等 2020, 阮惠婷等 2020)、遗传图谱构建 (宋文涛等 2011) 等研究。但由于裂腹鱼类均为多倍体类型, 等位基因确定复杂、分析软件缺乏等因素导致有关裂腹鱼微卫星位点开发的研究较少 (刘峰林等 2023), 仅青海湖裸鲤 (*G. przewalskii*) (蒋鹏等 2009)、扁吻鱼 (*Aspiorhynchus laticeps*) (郝卓然等 2012)、厚唇裸重唇鱼 (*Gymnodiptychus pachycheilus*) (刘峰林等 2023) 等少数裂腹鱼类有相关的报道。因此, 本研究对祁连裸鲤、黄河裸裂尻鱼和嘉陵裸裂尻鱼基因组进行高通量测序, 并基于测序数据筛选出上述 3 种裂腹鱼通用的 21 对微卫星引物, 并利用其对这 3 个物种 16 个群体的遗传多样性进行评估, 为 3 种裂腹鱼的保护提供分子数据资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究所用 3 种裂腹鱼样本均均在 2017 至 2022 年采自黄河流域的渭河、洮河、大夏河, 长江流域的嘉陵江支流白龙江, 以及疏勒河、黑河和石羊河等内陆河水系, 共 16 个群体 (图 1), 309 尾 (表 1)。取样本的部分右侧胸鳍保存于 95% 乙醇中用于后续 DNA 提取。

表 1 3 种裂腹鱼类的采样点信息

Table 1 Sample information of 3 Schizothoracinae species

物种 Species	采样点 Sampling location	水系 Drainage	个体数 (尾) Number of individual (ind)	经纬度 Longitude and latitude
祁连裸鲤 <i>Gymnocypris chilianensis</i>	昌马 Changma	疏勒河 Shulehe River	29	97°10'37" E, 39°05'38" N
	皇城 Huangcheng	石羊河 Shiyanghe River	7	101°40'08" E, 37°53'05" N
	黄羊 Huangyang	石羊河 Shiyanghe River	37	102°28'35" E, 37°24'22" N
	西大 Xida	石羊河 Shiyanghe River	35	101°16'44" E, 37°55'10" N
	张掖 Zhangye	黑河 Heihe River	2	100°07'16" E, 39°20'27" N
黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i>	祁连 Qilian	黑河 Heihe River	27	99°54'05" E, 38°16'62" N
	黄羊 Huangyang	石羊河 Shiyanghe River	8	102°28'35" E, 37°24'22" N
	石门 Shimen	渭河 (黄河) Weihe River (Yellow River)	7	104°15'02" E, 35°08'37" N
	碌曲 Luqu	洮河 (黄河) Taohe River (Yellow River)	6	102°19'41" E, 34°36'10" N
	夏河 Xiahe	大夏河 (黄河) Daxiahe River (Yellow River)	11	102°14'05" E, 34°58'14" N
嘉陵裸裂尻鱼 <i>S. kialingensis</i>	卓尼 Zhuoni	洮河 (黄河) Taohe River (Yellow River)	13	103°06'19" E, 34°39'33" N
	石门 Shimen	渭河 (黄河) Weihe River (Yellow River)	33	104°15'02" E, 35°08'37" N
	宕昌 Tanchang		27	103°52'08" E, 33°59'24" N
	舟曲 Zhouqu	白龙江 (嘉陵江)	10	103°29'33" E, 33°58'52" N
	腊子口 Lazikou	Bailongjiang River (Jialingjiang River)	33	103°06'59" E, 34°06'06" N
	迭部 Diebu		24	102°42'15" E, 34°06'47" N

后进行毛细管荧光电泳进行等位基因分型。

1.5 数据分析

使用 GeneMaker 2.2.0 读取毛细管电泳检测结果, 并根据每个简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 位点的碱基重复单元进行数据校准, 获得基因分型数据。使用软件 PopGene 1.32 (Yeh et al. 1997) 计算群体遗传多样性参数, 包括等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、香浓指数 (H)、Nei's 基因多样性指数 (h)、多态位点百分率% (P), 并计算群体间 Nei's 遗传距离和遗传相似度。根据群体间 Nei's 遗传距离, 使用软件 Mega 7 画出 UPGMA 聚类树, Bootstrap 值设置为 1 000。利用软件 Structure (Porrás-Hurtado et al. 2013) 进行群体聚类分析, length of burn-in-period 参数设为 1×10^5 , MCMC 重复抽样次数为 1×10^6 , 聚类分组 K 值 (聚类分析中簇的数量) 分别取 1~17, 每个 K 值运算 10 次。通过计算连续 K

值和 ΔK 作折线图选择最佳 K 值, 其中 ($L(K)$) 为对数极大似然值, $\Delta K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{stdv}[L(K), |L''(K)|] = |L'(K+1) - L'(K)|, L'(K) = L(K) - L(K-1)$ (Evanno et al. 2005)。

2 结果

2.1 微卫星引物筛选

设计的 100 对引物中, 有 55 对可稳定扩增出条带。用毛细管电泳对初筛的 55 对引物进行检测分型, 获得 21 对扩增结果多态性较高的引物 (表 2)。以引物 M35 为例, 电泳分型见图 2, 微卫星位点大小分别为 245 bp 和 254 bp、245 bp 和 255 bp、240 bp 和 245 bp、245 bp 和 254 bp、244 bp、245 bp。碱基重复次数的多少是微卫星位点大小不同的原因, 不同个体之间的差异直接反映出位点的多态性。从图 2 看出, M35 位点在 3 物种的 6 个样品中表现出较高的多态性。

表 2 21 个微卫星位点信息及 PCR 引物信息

Table 2 Primer sequences and characteristics of 21 microsatellite loci

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'–3')	重复单元 Repeat motif	退火温度 (°C) Annealing temperature	产物大小 (bp) Product range
M02	F: AGCAGCTGACTGAGATGGGT R: TCATCTTGTTTGGCCTCCTC	(GCCCT)5	56	274
M08	F: TTTGTCACCAATTTCCCAAT R: CAGGGGTGGGATCTGATTCT	(TTTG)5	55	156
M11	F: CATCCCCTGACTCTGACACC R: AAATGCAGTTTCGGCTCAAC	(TATT)5	57	101
M18	F: GACCGATGCAGAATGGAAGT R: ACAGTGTGAGACCGCTTGTG	(ACAG)5	55	145
M23	F: TTTCTGCCATGCCTTTATCA R: CAGTGCAGATGCATTTCGTTT	(CATT)5	55	194
M26	F: CAAGTGCTGTTGAGTTTCCG R: CCTCAAGCCATCCCAACTTA	(TATG)5	56	122
M35	F: ATCTGCTCCACACAGACGTG R: CAAGCACCATCACAAAAGG	(TTAT)5	55	276
M38	F: TTTGAAATGAACGTCCACA R: GGACATGCAACGAGCAGTAA	(ATTT)5	55	210
M43	F: GCGGAACCACTGTATGGACT R: TGCTGTTTGCTTTCAGGATG	(CTTT)5	56	135
M49	F: CATGAACCACCACACCAGAG R: AACAGGCCATAACATCAGGC	(CGCA)5	55	168
M55	F: CGCAGGCATATTAGCATTCA R: AATTGTGCCTTCCCTGCTG	(AAAT)5	55	193
M58	F: CCAGCGAACGTTTCAGTGTA R: ACTCTCATTGCCCCTTCCC	(AACA)5	55	266
M66	F: AAACAAGATCAGTGACGGG R: GAGCTGACTGCACCATGAA	(GATG)5	54	131
M72	F: CAATAGATGCATTGCGTTGG R: TGAAATGCAAATCACAATCG	(TTTG)5	54	140
M79	F: ATGTGCGATTGCATGTTTGT R: AGTGGGTGAGGGTGAAAGTG	(GGAT)5	55	226
M81	F: AGCTTCTTAGCTTCTGGGGG R: GAAAAGCCAACAGCAGATCC	(GCTGGG)5	55	252
M85	F: ACTGGGTATGCCACTTCTCTG R: CTGTTCGTCCAATTGTCCCT	(CTGATG)5	55	194
M89	F: ATTCTGCATCAAACACTCGC R: TCTGCAAATGCACAGACTCC	(CAGAT)5	54	124
M90	F: ACGGTCAAATTCGTATCGG R: CGCATGTGTGTCTGAGTG	(ATTG)5	55	157
M93	F: TGCTGTTTGCTTTCAGGATG R: GCGGAACCACTGTATGGACT	(AAAG)5	54	135
M98	F: CAGAAAAAGCTGTGTTTGTGC R: GGTGTGAGGCTTTGCATTTT	(AAAC)5	55	205

2.2 群体遗传多样性分析

对 3 种裂腹鱼 16 个群体进行遗传多样性分析 (表 3), 3 个物种中, 黄河裸裂尻鱼的遗传多样性整体高于祁连裸鲤和嘉陵裸裂尻鱼。比

较 3 个物种内不同群体, 祁连裸鲤黄羊群体遗传多样性水平最高, 张掖群体最低; 黄河裸裂尻鱼祁连群体遗传多样性水平最高, 石门群体最低; 嘉陵裸裂尻鱼石门群体遗传多样性水平

最高，舟曲群体的最低。

2.3 群体遗传分化分析

利用软件 Structure 进行群体聚类分析，当 $K = 2$ 时， ΔK 出现峰值（图 3）对 3 种裂腹鱼类分群是最佳的，因此把所有群体分为 2 个理论群（图 4a），但是由于所有种群属于 3

个物种，因此我们也将 $K = 3$ 的结构图进行绘制分析（图 4b）。从图 4 可以看出，同域分布的祁连裸鲤黄羊群体与黄河裸裂尻鱼黄羊群体之间存在种间基因渐渗现象，嘉陵裸裂尻鱼石门群体与黄河裸裂尻鱼石门群体之间也存在种间基因渐渗现象。

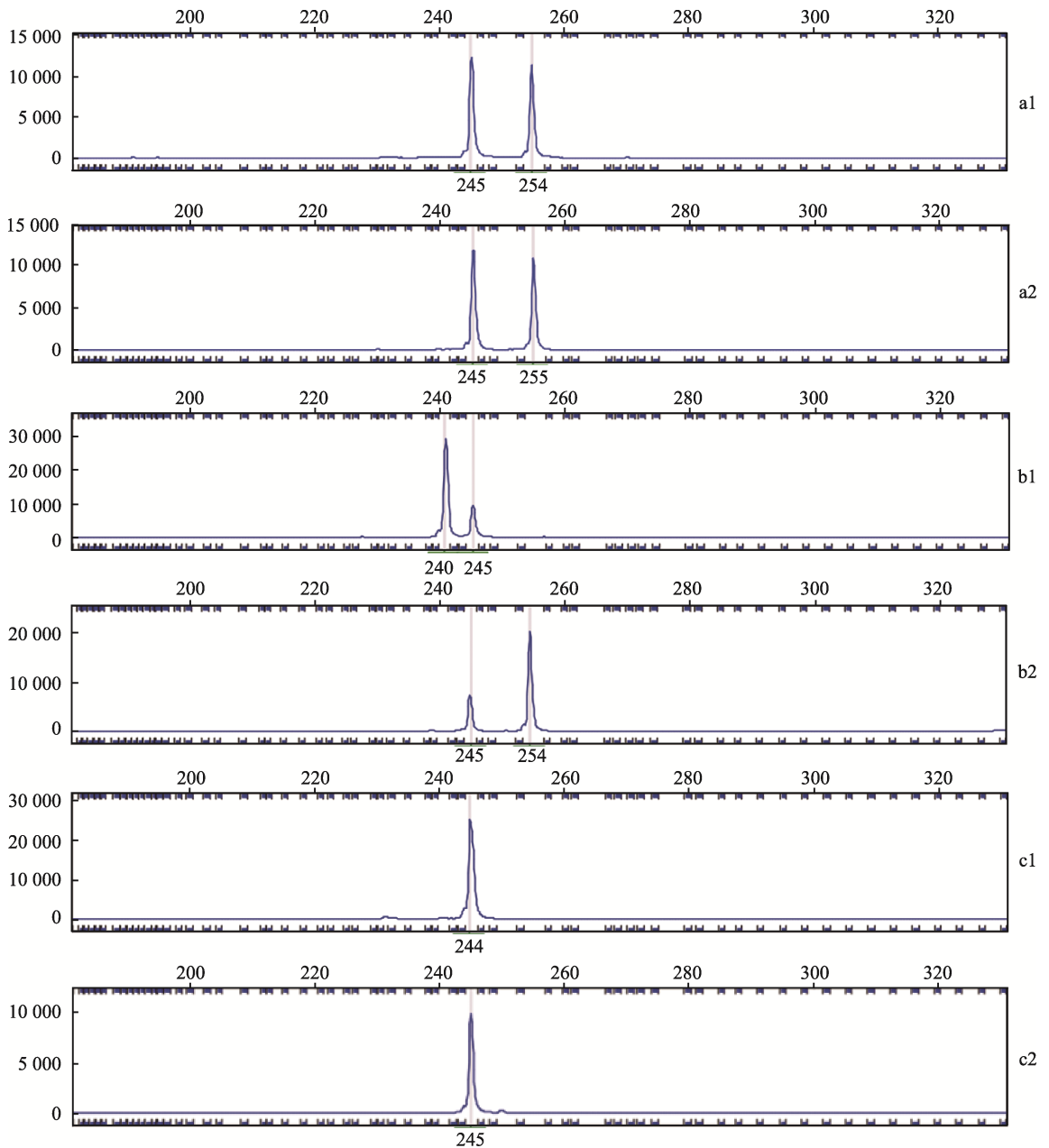


图 2 6 个裂腹鱼个体在 M35 位点的毛细管电泳峰图

Fig. 2 Capillary gel electrophoresis of the primer M35 in six Schizothoracine individuals

a. 黄河裸裂尻鱼; b. 嘉陵裸裂尻鱼; c. 祁连裸鲤。a. *Schizopygopsis pylzovi*; b. *S. kialingensis*; c. *Gymnocypris chilianensis*.

表 3 16 个裂腹鱼群体的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters in 16 populations of Schizothoracine

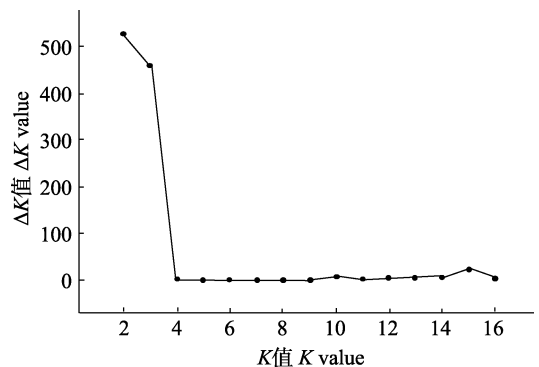
物种 Species	群体 Population	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基因 Effective number of alleles (N_e)	香浓指数 Shannon's index (I)	Nei's 基因多样性 指数 Nei's gene diversity (h)	多态位点百分率 (%) Percentage of polymorphic loci (P)
<i>Gymnocypris chilianensis</i>	祁连裸鲤 昌马 Changma	1.345	1.101	0.113	0.068	34.55
	皇城 Huangcheng	1.261	1.168	0.146	0.099	26.06
	黄羊 Huangyang	1.442	1.214	0.203	0.131	44.24
	西大 Xida	1.297	1.127	0.120	0.077	29.70
	张掖 Zhangye	1.042	1.042	0.029	0.021	4.24
<i>Schizopygopsis pylzovi</i>	祁连 Qilian	1.539	1.193	0.206	0.127	53.94
	黄羊 Huangyang	1.303	1.191	0.166	0.111	30.30
	石门 Shimen	1.236	1.126	0.120	0.078	23.64
	碌曲 Luqu	1.351	1.192	0.183	0.120	35.15
	夏河 Xiahe	1.436	1.206	0.202	0.129	43.64
	卓尼 Zhuoni	1.424	1.192	0.192	0.122	42.42
	嘉陵裸裂尻鱼 <i>S. kialingensis</i>	石门 Shimen	1.351	1.152	0.147	0.094
宕昌 Tanchang	1.272	1.093	0.099	0.061	27.27	
	舟曲 Zhouqu	1.181	1.089	0.088	0.057	18.18
	腊子口 Lazikou	1.327	1.105	0.113	0.069	32.73
	迭部 Diebu	1.224	1.083	0.084	0.052	22.42

2.4 群体间遗传距离分析

3 个物种的不同群体间 Nei's 遗传相似度和遗传距离分析见附录 1。嘉陵裸裂尻鱼的群体内, 白龙江水系的宕昌群体和黄河水系的石门群体的遗传相似度最低 (0.908), 遗传距离最大 (0.097); 白龙江水系的迭部和舟曲两个群体遗传相似度最高 (0.994), 遗传距离最小 (0.006)。黄河裸裂尻鱼的群体内, 洮河水系的卓尼群体和碌曲群体遗传相似度最高 (0.983), 遗传距离最小 (0.017); 渭河水系的石门群体和内陆河水系的黄羊群体遗传相似度最低 (0.901), 遗传距离最大 (0.104)。祁连裸鲤的群体内, 黑河水系的张掖群体和疏勒河水系的昌马群体的遗传相似度最高 (0.975), 遗传距离最小 (0.025); 石羊河水系的皇城群体和黑河水系的张掖群体的相似度最低 (0.904), 遗传距离最大 (0.101)。

根据群体间 Nei's 遗传距离基于 UPGMA

法对 3 个物种的 16 个群体聚类分析 (图 5), 黄河裸裂尻鱼和嘉陵裸裂尻鱼聚为一个大的分支, 又各自聚为一个小的分支; 祁连裸鲤和黄河裸裂尻鱼的黄羊河群体聚为一个分支。

图 3 Structure 分析中 ΔK 值与 K 值的关系Fig. 3 Change of ΔK with the changes of K by structure analysis

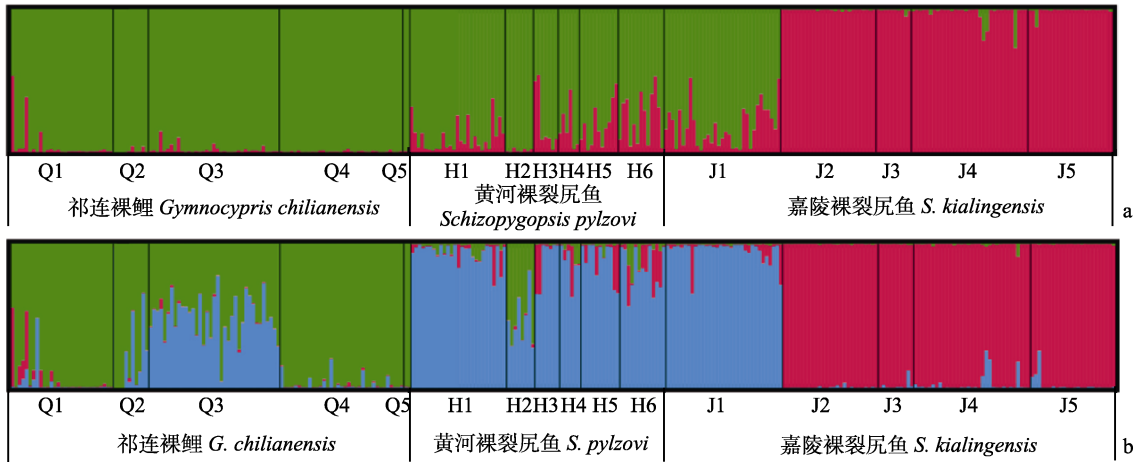


图 4 16 个裂腹鱼群体贝叶斯基型聚类分析

Fig. 4 Bayesian genotype clustering results for *K*-value of 16 Schizothoracine populations

a. $K = 2$, 两种颜色表示两个理论群; b. $K = 3$, 三种颜色表示三个理论群; 某些个体由两种或多种颜色组成说明此个体可能是从两个祖先亚群杂交而来, 存在基因渐渗现象。Q1. 祁连裸鲤昌马群体; Q2. 祁连裸鲤皇城群体; Q3. 祁连裸鲤黄羊群体; Q4. 祁连裸鲤西大群体; Q5. 祁连裸鲤张掖群体; H1. 黄河裸裂尻鱼祁连群体; H2. 黄河裸裂尻鱼黄羊群体; H3. 黄河裸裂尻鱼石门群体; H4. 黄河裸裂尻鱼碌曲群体; H5. 黄河裸裂尻鱼夏河群体; H6. 黄河裸裂尻鱼卓尼群体; J1. 嘉陵裸裂尻鱼石门群体; J2. 嘉陵裸裂尻鱼宕昌群体; J3. 嘉陵裸裂尻鱼舟曲群体; J4. 嘉陵裸裂尻鱼腊子口群体; J5. 嘉陵裸裂尻鱼迭部群体

a. $K = 2$, two colors represent the two theoretical groups; b. $K = 3$, three colors represent the three theoretical groups; The fact that some individuals are composed of two or more colors indicates that the individual may have interbred from two ancestral subgroups, and there is introgression of genes. Q1. Changma population of *Gymnocypris chilianensis*; Q2. Huangcheng population of *G. chilianensis*; Q3. Huangyang population of *G. chilianensis*; Q4. Xida population of *G. chilianensis*; Q5. Zhangye population of *G. chilianensis*; H1. Qilian population of *Schizopygopsis pylzovi*; H2. Huangyang population of *S. pylzovi*; H3. Shimen population of *S. pylzovi*; H4. Luqu population of *S. pylzovi*; H5. Xiahe population of *S. pylzovi*; H6. Zhuoni population of *S. pylzovi*; J1. Shimen population of *S. kialingensis*; J2. Tanchang population of *S. kialingensis*; J3. Zhouqu population of *S. kialingensis*; J4. Lazikou population of *S. kialingensis*; J5. Diebu population of *S. kialingensis*

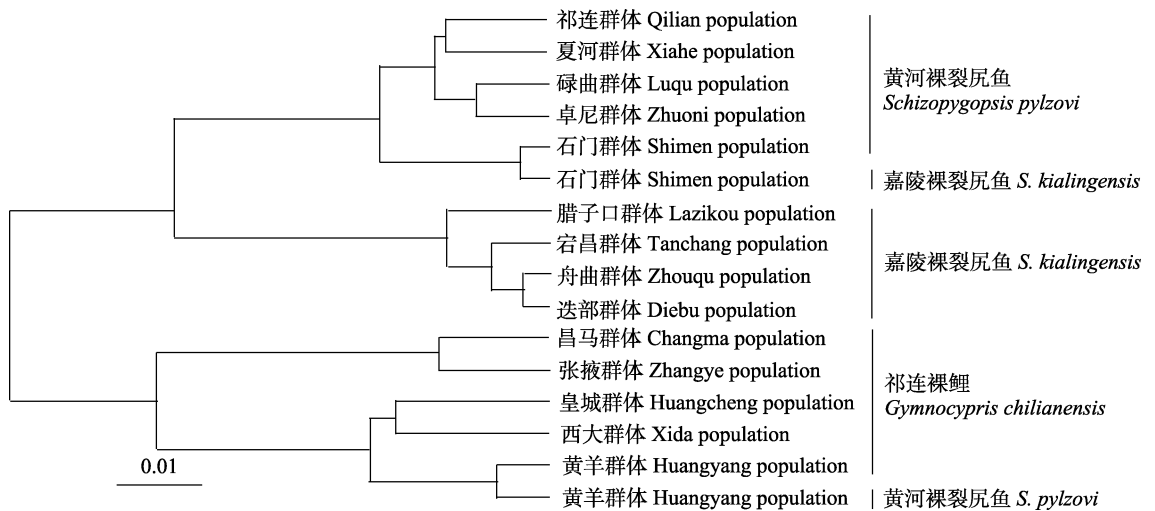


图 5 基于 Nei's 遗传距离构建的 3 种裂腹鱼类 16 个群体的 UPGMA 聚类树图

Fig. 5 UPGMA dendrogram of 16 Schizothoracine populations based on Nei's genetic distance

3 讨论

3.1 微卫星引物筛选

随着低成本、时间短、通量大等特点的高通量测序技术的普遍应用，随机进行基因组测序越来越方便。通过软件搜索获取微卫星序列（张智等 2019，刘峰林等 2023），比微卫星富集文库法和小片段 DNA 克隆法等传统的微卫星分离方法（孙效文等 2005）有更大的优势，已逐渐成为微卫星标记筛选的主要方法。尤其是针对较珍贵、缺乏分子数据的高原裂腹鱼类，通过高通量测序进行微卫星数据分析更容易且效率高。由于超过三碱基重复类型微卫星位点不容易发生滑带和等位基因丢失，在毛细管电泳分型时杂峰少，等位基因差距明显，读数较准确（Hoffman et al. 2009，刘峰林等 2023）。有许多研究认为，拥有相似重复次数的四碱基微卫星比二、三碱基重复微卫星的突变率更高（Weber et al. 1993，Eckert et al. 2000），长重复序列的、更多变异的四碱基重复微卫星在鱼类中是较为普遍的（Brooker et al. 1994，Greig et al. 2003），Liao 等（2006）对圆口铜鱼（*Coreius guichenoti*）的研究中发现，四碱基重复的微卫星有更高的等位基因多样性，认为筛选四碱基重复微卫星标记可能更适合鱼类分子群体遗传分析。因此本研究在筛选微卫星引物时优先选择了以 4 碱基为主要重复类型的位点，以保证能够获取高质量微卫星位点。与其他裂腹鱼类如斑重唇鱼（*Diptychus maculatus*）（葛锐等 2023）、花斑裸鲤（*G. eckloni*）（贺彩霞等 2024）相似，碱基数量越多的微卫星重复次数越少，4 碱基微卫星以重复 5 次为主。

3.2 3 种裂腹鱼种群遗传多样性

有效等位基因数（ N_e ）是分析微卫星分子标记多态性的重要指标，与观测等位基因数（ N_a ）越接近，表明筛选的微卫星标记越准确（Kimura et al. 1971）。本研究 3 种裂腹鱼的有效等位基因平均值（1.142）占观测等位基因平均值（1.314）的 87.0%，比同是鲤科鱼类高原

鳅属的叶尔羌高原鳅（*Triplophysa yarkandensis*）的 60.5%（赵文浩等 2023）和鲤科鲟亚科的飘鱼（*Pseudolaubuca sinensis*）的 60.6%（阮惠婷等 2020）要高，表明本研究筛选的微卫星标记具有较高的多态性，可有效分析 3 种裂腹鱼类种群间的遗传关系。多态位点百分率（ P ）是评估遗传多样性的重要指标，可以反映种群内遗传变异程度。3 种裂腹鱼的多态位点百分率，黄河裸裂尻鱼的平均值最大（38.18%），祁连裸鲤和嘉陵裸裂尻鱼的值接近，分别是 27.76% 和 27.15%。虽然多态位点百分率容易受样本大小的影响（徐敏 2013），但是本研究黄河裸裂尻鱼在样本量最少（72 尾）的情况下多态位点百分率最高，说明其遗传多样性较高，与 Cyt *b* 研究结果一致（娄晋铭等 2019）。香浓多样性指数（ I ）和 Nei's 基因多样性指数（ h ）也都显示，黄河裸裂尻鱼遗传多样性高于祁连裸鲤和嘉陵裸裂尻鱼，但都低于同是裂腹鱼类的塔里木裂腹鱼（*Schizothorax biddulphi*, I 0.426, h 0.286）（杨天燕等 2014），可能是由于微卫星重复类型的不同导致。

相关研究表明（闫路娜等 2004，包文斌等 2007，鲁翠云等 2008，牛东红等 2010，林婷婷 2017），在用微卫星做群体遗传多样性分析时，每个群体 30 ~ 50 个样本为较合适的样本量，样本量过多会增加工作量，样本量太少会影响实验效果。由于本研究样本全部为野生群体，采集数量随机性较大，不符合前人研究的最适样本量。但从黄河裸裂尻鱼样本量最少，且群体内分布也不均匀的情况下遗传多样性指数均最大、遗传多样性最高来看，样本数量不是微卫星分析的决定因素，而主要与群体本身遗传特征有关。3 个物种中黄河裸裂尻鱼的遗传多样性相对较高，可能是其相对于其他 2 个物种的分布范围比较广，且本研究的样本采自黄河不同的支流，互相之间杂交的可能性小，不同支流群体之间变异较大。嘉陵裸裂尻鱼的遗传多样性水平相对最低，原因可能是样品大多采自嘉陵江支流白龙江，由于白龙江上水电

工程密集,阻断了鱼类在上下游之间基因交流,使得不同河段嘉陵裸裂尻鱼之间由交配产生的遗传变异降低,从而适应环境能力下降,最终其种群数量减少,种质资源变得更加脆弱。

3.3 3种裂腹鱼种群分化

采用 21 对 SSR 引物对 3 种裂腹鱼 16 个群体的 309 尾样品进行遗传结构分析,祁连裸鲤黄羊群体与黄河裸裂尻鱼黄羊群体存在较明显的基因渐渗,黄河裸裂尻鱼黄羊群体更趋于是祁连裸鲤和黄河裸裂尻鱼的杂交种。基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类树也显示,二者亲缘关系较近。同时,嘉陵裸裂尻鱼石门群体与黄河裸裂尻鱼石门群体也存在基因渐渗,聚类树上也先聚到一个小分支。鱼类由于具有体外受精、通过竞争才能获得有限产卵场等特征,是脊椎动物中最容易发生基因渐渗的类群(罗雯 2016),所以在鱼类中出现杂交渐渗的现象比较多。同属物种之间存在基因渐渗,如涂著池(2011)研究发现,雅罗鱼属的准噶尔雅罗鱼(*Leuciscus merzbacheri*)与贝加尔雅罗鱼(*L. baicalensis*)之间存在基因杂交渐渗,Laakkonen 等(2015)研究的鲱属大西洋鲱(*Clupea harengus*)和太平洋鲱(*C. pallasii*)之间存在基因渐渗现象。在不同属物种之间基因渐渗也普遍存在,姚敏(2019)研究发现,直口鲮属的直口鲮(*Rectoris posehensis*)、蓝鲮属都安蓝鲮(*Lanlabeo duanensis*)和卷口鱼属的卷口鱼(*Ptychidio jordani*) 3 个物种呈现网状的基因渐渗现象。罗雯(2016)在研究中发现华鲮属的四川华鲮(*Sinibrama taeniatus*)与部分鲴属鱼类存在基因渐渗。黄河裸裂尻鱼繁殖时间在 7 和 8 月份,嘉陵裸裂尻鱼和祁连裸鲤繁殖时间均在 6 和 7 月份,黄河裸裂尻鱼与嘉陵裸裂尻鱼、祁连裸鲤产卵时间存在一定重叠,在同一水域的两种鱼之间则可能发生杂交、基因交流,进而可能发生基因渐渗。

总体上,本研究 3 个物种种内群体间遗传距离大小与其地理分布基本一致,来自洮河水系的黄河裸裂尻鱼碌曲群体和卓尼群体、来自

石羊河的祁连裸鲤皇城群体和西大群体有更近的遗传距离。在嘉陵裸裂尻鱼种群,都属于嘉陵江流域的腊子口、宕昌、舟曲和迭部 4 个群体之间遗传距离较小,4 个群体在 UPGMA 聚类树也聚到一支。腊子口群体和迭部群体的地理距离最近,但 2 群体之间的遗传差异相对较大,说明对于嘉陵裸裂尻鱼来说,除地理隔离外,大量梯级电站的修建将白龙江分段成不连续水体,大坝阻隔了上下游鱼类的基因交流,导致了遗传分化。这与王太等(2017)基于线粒体控制区对嘉陵裸裂尻鱼种群遗传结构研究的结果一致。

参 考 文 献

- Brooker A L, Cook D, Bentzen P, et al. 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(9): 1959–1966.
- Eckert K A, Yan G. 2000. Mutational analyses of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites in *Escherichia coli*: influence of sequence on expansion mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 28(14): 2831–2838.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611–2620.
- Greig C, Jacobson D P, Banks M A. 2003. New tetranucleotide microsatellites for fine-scale discrimination among endangered Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Molecular Ecology Notes*, 3(3): 376–379.
- 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.
- Kimura M, Maruyama T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genetical Research*, 18(2): 125–131.
- Laakkonen H M, Strelkov P, Lajus D L, et al. 2015. Introgressive hybridization between the Atlantic and Pacific herrings (*Clupea harengus* and *C. pallasii*) in the north of Europe. *Marine Biology*,

- 162(1): 39–54.
- Liao X L, Zhu B, Yu X M, et al. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, brass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker). *Molecular Ecology Notes*, 6(2): 393–395.
- Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, et al. 2013. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4: 98.
- Wang T, Jiao W L, Zhang Y P, et al. 2016. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Gymnocypris chilianensis* (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(6): 4015–4016.
- Weber J L, Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2(8): 1123–1128.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. 1997. PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis, molecular biology and biotechnology center, University of Alberta.
- Zhao K, Duan Z Y, Peng Z G, et al. 2011. Phylogeography of the endemic *Gymnocypris chilianensis* (Cyprinidae): sequential westward colonization followed by allopatric evolution in response to cyclical Pleistocene glaciations on the Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(2): 303–310.
- 包文斌, 束婧婷, 许盛海, 等. 2007. 样本量和性比对微卫星分析中群体遗传多样性指标的影响. *中国畜牧杂志*, 43(1): 6–9.
- 晁燕, 祁得林, 申志新, 等. 2011. 黄河裸裂尻鱼细胞色素 C 氧化酶 I、II 和 III 亚基基因的克隆及序列特征分析. *动物学杂志*, 46(4): 16–24.
- 冯晓婷, 杨习文, 杨雪军, 等. 2019. 基于微卫星标记对长江江苏段鳊增殖放流效果评估. *中国水产科学*, 26(6): 1185–1193.
- 葛锐, 强壮, 聂竹兰, 等. 2023. 基于高通量转录组测序的斑重唇鱼 SSR 分布及序列特征分析. *南方农业学报*, 54(3): 806–814.
- 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.
- 何勇凤, 朱永久, 吴兴兵, 等. 2019. 基于微卫星标记的圆口铜鱼亲子鉴定技术. *水生生物学报*, 43(6): 1216–1223.
- 贺彩霞, 李长忠, 金文杰, 等. 2024. 基于转录组测序的花斑裸鲤 SSR、SNP 和 InDel 位点特征分析. *大连海洋大学学报*, 39(1): 48–56.
- 黄承勤, 黄英毅, 黄欣, 等. 2020. 湖栖鳍虾虎鱼微卫星 DNA 标记的开发与群体遗传多样性分析. *动物学杂志*, 55(1): 67–76.
- 蒋鹏, 史建全, 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.
- 乐佩琦. 2000. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲤形目 (下卷). 北京: 科学出版社, 352–386.
- 李兰兰, 邢露梅, 俞兆曦, 等. 2021. 基于微卫星多重 PCR 技术的兰州鲇亲子鉴定. *水生生物学报*, 45(3): 530–540.
- 李思忠, 张世义. 1974. 甘肃省河西走廊鱼类新种及新亚种. *动物学报*, 20(4): 414–419.
- 林婷婷. 2017. 大刺鲃 (*Mastacembelus armatus*) 微卫星标记开发及野生群体遗传多样性分析. 广州: 广州大学硕士学位论文, 53–55.
- 刘峰林, 王泽松, 王太, 等. 2023. 基于高通量测序的厚唇裸重唇鱼微卫星分子标记筛选. *动物学杂志*, 58(6): 817–826.
- 姜晋铭, 张智, 王太, 等. 2019. 甘肃省 3 种裂腹鱼遗传多样性与地理种群分化. *华中农业大学学报*, 38(4): 77–84.
- 鲁翠云, 金万昆, 孙效文, 等. 2008. 样本容量对养殖群体内主要遗传结构分析参数的影响. *水产学报*, 32(5): 674–683.
- 罗雯. 2016. 鲂鳊鱼类 (鲤形目; 鲤科; 鲂亚科) 系统发育关系及其杂交渐渗研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 45–51.
- 马宝珊, 魏开金, 赵天一, 等. 2023. 裂腹鱼类系统进化及高原适应性研究进展. *湖泊科学*, 35(3): 808–824.
- 牛东红, 陈慧, 林国文, 等. 2010. 缙蛭群体微卫星分析中样本量对遗传多样性指标的影响. *海洋科学进展*, 28(2): 203–208.
- 祁得林, 晁燕, 郭松长, 等. 2008. 黄河裸裂尻鱼五种群 mtDNA 控制区的遗传结构. *动物学报*, 54(6): 972–980.
- 阮惠婷, 徐姗楠, 李敏, 等. 2020. 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. *水生生物学报*, 44(3): 501–508.
- 宋文涛, 张潇赜, 廖小林, 等. 2011. 牙鲈微卫星标记遗传连锁图谱的构建. *农业生物技术学报*, 19(6): 981–987.
- 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 2005. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选微卫星的比较研究. *中国水产科学*, 12(2): 126–132.
- 唐文家. 2008. 黄河裸裂尻鱼遗传多样性研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 9–10.
- 涂著池. 2011. 准噶尔雅罗鱼遗传多样性及其同域同属种间基因

渐渗研究. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 28–40.

王太, 杜岩岩, 杨濯羽, 等. 2017. 基于线粒体控制区的嘉陵裸裂尻鱼种群遗传结构分析. *生态学报*, 37(22): 7741–7749.

王香亭. 1991. 甘肃脊椎动物志. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 106–107.

伍献文. 1964. 中国鲤科鱼类志-上卷. 上海: 上海科学技术出版社, 137–197.

徐敏. 2013. 秦岭地区 4 种五味子 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文, 37–39.

闫路娜, 张德兴. 2004. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响. *动物学报*, 50(2): 279–290.

杨天燕, 孟玮, 高天翔, 等. 2014. 塔里木裂腹鱼群体的微卫星多态性分析. *干旱区研究*, 31(6): 1109–1114.

杨友桃, 张迎梅. 1991. 河西走廊鱼类区系及其演变的研究. *兰州大学学报*, 27(4): 141–144.

姚敏. 2019. 野鲮亚科一新属一新种的建立及其种间杂交渐渗研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 35–65.

张智, 俞丹, 刘飞, 等. 2019. 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. *水生生物学报*, 43(6): 1224–1230.

赵凯, 杨公社, 李俊兵, 等. 2006. 黄河裸裂尻鱼群体遗传结构和 *Cyt b* 序列变异. *水生生物学报*, 30(2): 129–133.

赵文浩, 易少奎, 周琼, 等. 2023. 新疆塔里木河叶尔羌高原鳅群体遗传学研究. *水产科学*, 42(4): 664–673.

附录 1 16 个群体间的遗传距离（对角线以下）和 Nei's 遗传相似度（对角线以上）
Appendix 1 Genetic distance (below diagonal) and Nei's genetic identity (above diagonal)
of 16 populations of Schizothoracinae

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	H1	H2	H3	H4	H5	H6	J1	J2	J3	J4	J5
Q1		0.915	0.926	0.914	0.975	0.894	0.913	0.869	0.903	0.904	0.901	0.879	0.851	0.851	0.854	0.858
Q2	0.089		0.972	0.965	0.904	0.911	0.956	0.899	0.907	0.912	0.917	0.906	0.846	0.851	0.841	0.851
Q3	0.077	0.028		0.959	0.919	0.941	0.988	0.916	0.934	0.936	0.943	0.923	0.866	0.876	0.865	0.878
Q4	0.090	0.035	0.042		0.911	0.879	0.951	0.873	0.886	0.877	0.887	0.881	0.839	0.848	0.837	0.844
Q5	0.025	0.101	0.085	0.094		0.875	0.902	0.855	0.875	0.886	0.884	0.862	0.829	0.833	0.840	0.839
H1	0.112	0.094	0.061	0.129	0.134		0.927	0.963	0.968	0.977	0.982	0.964	0.911	0.918	0.911	0.921
H2	0.091	0.045	0.012	0.050	0.104	0.075		0.901	0.916	0.920	0.925	0.909	0.856	0.862	0.856	0.868
H3	0.141	0.107	0.088	0.136	0.156	0.038	0.104		0.955	0.953	0.963	0.994	0.913	0.925	0.916	0.927
H4	0.103	0.098	0.068	0.121	0.134	0.033	0.088	0.046		0.968	0.983	0.958	0.917	0.929	0.920	0.930
H5	0.101	0.092	0.066	0.131	0.122	0.024	0.083	0.048	0.033		0.980	0.957	0.911	0.915	0.911	0.919
H6	0.105	0.087	0.058	0.120	0.124	0.019	0.078	0.038	0.017	0.020		0.964	0.926	0.934	0.925	0.935
J1	0.129	0.098	0.080	0.127	0.149	0.037	0.095	0.006	0.043	0.044	0.036		0.908	0.918	0.910	0.920
J2	0.161	0.168	0.143	0.176	0.187	0.094	0.155	0.091	0.086	0.093	0.077	0.097		0.987	0.971	0.988
J3	0.161	0.162	0.133	0.165	0.183	0.086	0.148	0.078	0.0741	0.089	0.068	0.086	0.013		0.981	0.994
J4	0.158	0.173	0.145	0.178	0.174	0.093	0.155	0.088	0.084	0.093	0.078	0.095	0.029	0.019		0.979
J5	0.153	0.161	0.131	0.169	0.175	0.082	0.141	0.076	0.073	0.085	0.067	0.084	0.013	0.006	0.021	

Q1. 祁连裸鲤昌马群体; Q2. 祁连裸鲤皇城群体; Q3. 祁连裸鲤黄羊群体; Q4. 祁连裸鲤西大群体; Q5. 祁连裸鲤张掖群体; H1. 黄河裸裂尻鱼祁连群体; H2. 黄河裸裂尻鱼黄羊群体; H3. 黄河裸裂尻鱼石门群体; H4. 黄河裸裂尻鱼碌曲群体; H5. 黄河裸裂尻鱼夏河群体; H6. 黄河裸裂尻鱼卓尼群体; J1. 嘉陵裸裂尻鱼石门群体; J2. 嘉陵裸裂尻鱼宕昌群体; J3. 嘉陵裸裂尻鱼舟曲群体; J4. 嘉陵裸裂尻鱼腊子口群体; J5. 嘉陵裸裂尻鱼迭部群体

Q1. Changma population of *Gymnocypris chilianensis*; Q2. Huangcheng population of *G. chilianensis*; Q3. Huangyang population of *G. chilianensis*; Q4. Xida population of *G. chilianensis*; Q5. Zhangye population of *G. chilianensis*; H1. Qilian population of *Schizopygopsis pylzovi*; H2. Huangyang population of *S. pylzovi*; H3. Shimen population of *S. pylzovi*; H4. Luqu population of *S. pylzovi*; H5. Xiahe population of *S. pylzovi*; H6. Zhuoni population of *S. pylzovi*; J1. Shimen population of *S. kialingensis*; J2. Tanchang population of *S. kialingensis*; J3. Zhouqu population of *S. kialingensis*; J4. Lazikou population of *S. kialingensis*; J5. Diebu population of *S. kialingensis*