

湘西盲高原鳅遗传多样性的微卫星分析

姚雁鸿^{1,2}, 孔令富³, 汪登强¹, 何文辉⁴, 何力¹, 余来宁^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

3. 云南农业大学动物科技学院, 云南 昆明 650201;

4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用筛选的 16 对微卫星标记对来自于湖南湘西龙山县乌龙山 3 个不同洞穴的盲高原鳅群体进行遗传多样性及遗传分化分析。通过计算多态信息含量、平均杂合度、等位基因数、遗传距离、基因流、*F*-统计量等参数, 评估各盲高原鳅群体遗传多样性和各群体间遗传分化。16 个微卫星标记在 3 个群体中共检测出 83 个等位基因。每个座位检测到 3~8 个等位基因不等。3 个群体各个多态位点的平均观测杂合度分别为 0.362 5~0.946 5, 平均期望杂合度为 0.538 6~0.906 5。3 个群体多态微卫星位点的 *PIC* 分别为 0.263 2、0.231 3、0.303 5, 选取的 16 个微卫星位点中 2 个为高度多态, 2 个为低度多态, 其余为中度多态。分子变异方差分析 (AMOVA) 结果表明, 遗传变异大部分 (92.84%) 来自群体内, 仅有 7.16% 的变异来自于群体间, 数据表明 3 个群体处于未分化状态, 遗传一致性较大。

关键词: 湘西盲高原鳅; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

湘西盲高原鳅 (*Triplophysa xiangxiensis*) 属鲤形目 (Cypriniformes)、鳅科 (Cobitidae)、高原鳅属 (*Triplophysa*), 分布于湖南龙山县火岩乡多个溶洞的地下河中, 该地下河属于沅江水系的支流酉水河。1986 年湘西盲高原鳅首次被杨干荣等^[1] 描述并被定名为湘西盲条鳅 (*Noemacheilinae xiangxiensis* sp. nov.); 1992 年中国科学院昆明动物研究所的陈银瑞等^[2] 对模式标本分析后, 根据新的分类系统重新定名为湘西盲高原鳅 (*Triplophysa xiangxiensis* Yang et al)^[3]。湘西盲高原鳅是典型的洞穴鱼类, 自 1976 年我国首次报道发现洞穴鱼类以来, 至今已报道喀斯特典型洞穴鱼类 48 种, 除湘西盲高原鳅分布于湖南省外, 其它均分布于云南、广西、贵州三省^[4]。洞穴鱼类以其特殊的生活环境, 以及适应该环境的独特构造, 而成为鱼类辐射进化中的一个分支, 是医学和遗传实验的良好材料, 目前洞穴盲鱼已经成为

退化进化生物学研究的模式种^[5]。此外, 高原鳅属鱼类的起源可能与青藏高原的隆起相关^[6], 在研究物种起源与演化上有重要意义。

目前, 国外对洞穴鱼类开展了较深入的研究, 在适应性进化、种群遗传取得了不少成果^[7-11]。我国对于洞穴鱼类的研究以形态、分类为主, 分子水平的研究还较少。如 Li 等^[12] 分析了我国鲤科洞穴鱼类视蛋白的适应性进化, 何德奎等^[6] 研究了高原鳅属鱼类分子系统演化, 贺刚等^[13] 采用同工酶分析了湘西盲高原鳅的生化水平上的变异, 还没见到我国洞穴鱼种群遗传分析的报道。

微卫星 DNA 标记呈共显性的孟德尔式遗传, 具有多态性高、共显性遗传、选择中性、易于操作等优点, 因此成为目前遗传学研究领域中应用最广泛的分子标记之一, 被广泛应用于个体间亲缘关系鉴定、种群遗传分析、遗传疾病诊断、基因定位、遗传作图等研究领域^[14]。本实验通过开发

收稿日期: 2011-11-02 修回日期: 2012-01-17

资助项目: 国家科技支撑计划 (2004BA526B10); 国家科技部公益性行业专项 (200903048)

通信作者: 余来宁, E-mail: yulaininghb@gmail.com

湘西盲高原鳅的微卫星标记,并用其研究湘西盲高原鳅的种群遗传多样性结构,了解湘西盲高原鳅的种质资源及遗传多样性特点,为洞穴鱼类的开发保护等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

湘西盲高原鳅样品于 2008、2009、2010 年 3

次采集,共 103 尾,采集地为湖南龙山县火岩乡飞虎洞和无名小溶洞(图 1,其中无名小溶洞 1 位于飞虎洞东北下方山脚下,两洞水平距离约 500 m;无名小溶洞 2 位于飞虎洞西南下方山脚下,两洞水平相距约 3 000 m),采集信息见表 1。每尾样品鱼取少量尾鳍组织分别编号保存于 95% 的酒精中。



图 1 湘西盲高原鳅样本采集点

Fig. 1 Sampling localities of *T. xiangxiensis*

表 1 三次采样基本信息
Tab. 1 Sampling information of *T. xiangxiensis*

采样日期 sampling date	采样地点 sampling site	尾数 no.	个体规格/g specification
2008-05	飞虎洞洞内 200 m 暗河	41	1.0 ~ 12.5
2009-11	无名小溶洞 1 暗河	26	1.7 ~ 12.3
2010-11	无名小溶洞 2 暗河	36	2.1 ~ 14.6

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 采用高盐法^[15]提取基因组 DNA。

(1) 取材、烘干:取鱼背部肌肉约 50 mg 于 2.0 mL 的 Eppendorf 管中,剪碎组织;并置于 56 °C 的恒温箱中至组织中的酒精去除;

(2) 消化:在上述 Eppendorf 管中加 500 μL HOM Buffer (80 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, 0.5% SDS, pH 8.0) 和 10 μL 蛋白酶 K, 在 55 °C 消化 3 h 以上(期间要每 30 分钟振荡一次),直至消化完全(溶液完全透明);

(3) 抽提:加入 500 μL NaCl (4.5 mol/L) 和 300 μL 氯仿,充分混匀 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min; 将上清液(约 850 μL) 转移到另一离心管;

(4) 沉淀 DNA:加入 600 μL 的异丙醇(0.7 倍体积),混匀, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液;

(5) 漂洗:加入 0.5 mL 70% 的乙醇,洗涤 5 min, 以 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液;

(6) 干燥沉淀,并用 TE 缓冲液或灭菌水溶解。

引物的开发 采用磁珠富集法^[16-17]和生物素标记的 (AC)₁₂ 探针从一尾鱼中分离微卫星 DNA。富含微卫星的 DNA 片段连接到 pMD18-T 载体,并转化到感受态细胞。采用通用引物 M13 以及 (AC)₁₂BN (B = C/G/T, N = A/C/G/T) 通过 3 次 PCR 过程确定阳性克隆以及微卫星序列在插入 DNA 片段中适中的位置。对阳性克隆进行双向测序,在线工具 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssritool>) 查找微卫星序列,并用 primer premier v6. 1 软件 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) 设计引物。

引物的筛选和群体分析 首先用设计的引物对 7 尾湘西盲高原鳅个体进行全基因组扫描,以确定引物的稳定性和多态性。反应体系为 25 μL: 10 × Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.2 μL, 引物各 0.8 μL (10 pmol/μL), Taq 酶 1 U, 模板 45 ~ 60 ng, 用 ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 4 min, 再 94 °C 变性 40 s, 48 ~ 56 °C (表 2) 复性 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环,最后 72 °C 再延伸 6 min。扩增产物用 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,80 V 电压电

泳过夜。电泳结束后进行银染,照相,以 10 bp ladder DNA marker 为分子量对照,软件 Quantity (Bio-RAD) 确定等位基因大小。

选用扩增稳定且具有多态性的引物对所有 3 年样品进行 PCR 扩增和电泳分型,条件同前。

表 2 微卫星标记引物序列、退火温度及片段大小

Tab. 2 Primer sequences, annealing temperature and fragment size of the microsatellite makers

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature	片段大小/bp fragment size	GenBank 登录号 accession no.
Trx1	F:CGCTACAATACTATAGTGCAGC	55	156 ~ 207	JN696735
	R:GGATTCCCTACACTGGTTTGTG	55		
Trx2	F:TTTATTAGAGTCGTGACACAGGC	57	181 ~ 238	JN696736
	R:CGAACACCTGTCAAATACCG	57		
Trx3	F:TGAGGCGTATGGCGTATGT	53	135 ~ 176	JN696737
	R:CAATGGCCCAATGAGTGTT	53		
Trx4	F:TTTACAGCCGACAGAAGC	51	162 ~ 218	JN696738
	R:CAGTGACGGAACTCAAAGATA	51		
Trx5	F:AAGGGGCTTTGTTCCAGTA	56	203 ~ 246	JN696739
	R:CGAGAAAATCCGATACCCA	56		
Trx6	F:GTGCCTTGGAGTGGACAGA	52	169 ~ 197	JN696740
	R:CGCAGCCTAAATGACAGAG	52		
Trx7	F:TTCTGCCAAGATCATTGTCTG	56	190 ~ 248	JN696741
	R:GATTTTCCGATTTCTTACCGT	56		
Trx8	F:ACACGAAATGAAGTATTCCTCT	53	150 ~ 188	JN696742
	R:AATCTCTGCAGCACACCC	53		
Trx9	F:CAGGCTGTCTGAAGGTCCA	51	153 ~ 178	JN696743
	R:GGTCATCTGAGTAGGACATTT	51		
Trx10	F:CATTTTTCACAGTGTAAGGC	51	135 ~ 196	JN696744
	R:GGAGGTAAGATGCGGATT	51		
Trx11	F:ACAGGATACAGAAGAAACAGG	49	182 ~ 278	JN696745
	R:TCAGAGACAGAGAATAATAAA	49		
Trx12-1	F:AACAGGAAGTGCACAAGTG	51	117 ~ 169	JN696746
	R:TTGACTGCGCTTCTGTG	51		
Trx12-2	F:ATGAAACAAACAGACATACAGT	49	109 ~ 138	JN696746
	R:TGTGTGAGATTTTCAGAAGATC	49		
Trx13	F:AAACAGCTTCAAGATGCCCATCG	52	186 ~ 221	JN696747
	R:TATCTGAGTAGGTTGCAGCA	52		
Trx14	F:ATCTCTGCTAGTCTGCTGG	52	221 ~ 256	JN696748
	R:TTATACCGTACCTTTCCTTTG	52		
Trx15	F:GCTCATTGTGGTGTATTT	48	229 ~ 265	JN696749
	R:ATGTGCATCTACAGTAGGC	48		

1.3 数据统计与分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳图,确定各电泳带对应的等位基因。利用软件 POPGENE 3.2 软件统计以下参数:等位基因数(number of alleles, A),有效等位基因数(effective number of alleles, N_e);基因观测杂合度和期望杂合度(observed heterozygosity, H_o ; expected heterozygosity, H_e);基

因多态信息含量(PIC);偏离 Hardy-Weinberg 显著性检验(P)等。用 Arlequin 2.0 软件计算群体间分子方差分析(Analysis of Molecular Variance)。

2 结果

2.1 湘西盲高原鳅微卫星等位基因与座位变异
本研究共设计了 43 对引物,其中筛选得到 16

个具有多态性的微卫星标记(表2)。这16个引物全部用于3年份的群体研究,分别检测到3~8个等位基因,其中Trx9最多,为8个,Trx7最少,为3个,共检测出83个等位基因,平均每个座位约5.18个等位基因(表3)。2008、2009、2010年3年群体的等位基因数分别为81、75、77个(表4)。

2.2 湘西盲高原鳅群体遗传多样性与 Hardy-Weinberg 平衡

杂合度方面,位点Trx15期望杂合度最高,达0.9065,Trx1最低,为0.4015。群体样本中,2008、2009、2010年3个群体各个多态位点的平均观测杂合度分别为0.7342、0.7891、0.6932,平均期望杂合度为0.7989、0.7335、0.7275,无论观测杂合度还是期望杂合度2008年都是最高的。但是多态信息含量(PIC)普遍较低,只有Trx4和Trx15超过0.5,分别是0.5145和0.5212(表3)。

对各群体每个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡的 χ^2 检验,2009年群体中Trx7位点、2010年群体Trx13位点和Trx15位点、2008年群体Trx13位点和Trx15位点等组合的检验结果均表现出明显的平衡偏离,其中2008年群体Trx15位点极显著偏离平衡。具体检验结果见表5。

表3 湘西盲高原鳅16个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量

Tab.3 Number of effective alleles, expected and observed heterozygosity and polymorphism information content for 16 microsatellite loci of *T. xiangxiensis*

位点 locus	A	N_e	H_o	H_e	PIC
Trx1	5	3.1568	0.8694	0.8015	0.3449
Trx2	4	3.1789	0.5432	0.7250	0.4574
Trx3	5	4.1453	0.6382	0.7511	0.3243
Trx4	4	3.8562	0.7842	0.7600	0.5145
Trx5	6	5.3876	0.7276	0.8915	0.3793
Trx6	7	5.8589	0.8918	0.8216	0.4490
Trx7	3	2.6792	0.3625	0.5386	0.2331
Trx8	5	4.5671	0.7667	0.6831	0.3581
Trx9	8	6.7835	0.9070	0.8738	0.3911
Trx10	4	3.4525	0.5830	0.7062	0.3492
Trx11	7	6.3453	0.8570	0.7395	0.4829
Trx12-1	6	4.1251	0.7102	0.7678	0.4807
Trx12-2	4	3.4595	0.9465	0.8033	0.2021
Trx13	5	3.8412	0.7732	0.8814	0.3121
Trx14	4	3.0925	0.5237	0.6432	0.3705
Trx15	6	5.0939	0.8796	0.9065	0.5212
2008	5.06	4.2678	0.7342	0.7989	0.2632
2009	4.69	4.6569	0.7891	0.7335	0.2313
2010	4.81	3.8568	0.6932	0.7275	0.3035

表4 16个微卫星标记在3个群体的遗传特性

Tab.4 Genetic characteristics of 16 microsatellite loci in three *T. xiangxiensis* populations

位点 locus	2008			2009			2010		
	A	H_o	H_e	A	H_o	H_e	A	H_o	H_e
Trx1	4	0.8783	0.8119	5	0.8683	0.7908	5	0.8617	0.8019
Trx2	4	0.5325	0.7371	4	0.5461	0.6878	4	0.551	0.7502
Trx3	5	0.6003	0.7235	4	0.7111	0.7889	5	0.6034	0.7411
Trx4	4	0.7958	0.7962	4	0.7937	0.7399	4	0.7636	0.7429
Trx5	6	0.7035	0.8987	5	0.7578	0.8715	6	0.7219	0.9054
Trx6	7	0.8917	0.8416	6	0.9357	0.8417	6	0.8481	0.7816
Trx7	3	0.2931	0.5917	3	0.5795	0.5178	3	0.3201	0.4565
Trx8	5	0.7831	0.6998	5	0.8128	0.6381	4	0.7052	0.7115
Trx9	7	0.9489	0.8521	6	0.9516	0.9261	8	0.8226	0.8433
Trx10	4	0.6423	0.7746	4	0.6016	0.7183	4	0.5151	0.6255
Trx11	7	0.8371	0.8314	5	0.9108	0.6689	4	0.8332	0.7183
Trx12-1	6	0.7382	0.7989	6	0.7916	0.7351	6	0.6012	0.7396
Trx12-2	4	0.9382	0.8825	4	0.9614	0.7805	4	0.9403	0.7471
Trx13	5	0.7715	0.9321	5	0.8269	0.8511	5	0.7211	0.8611
Trx14	4	0.5128	0.6878	4	0.6433	0.6287	4	0.4573	0.6132
Trx15	6	0.8793	0.9213	5	0.9336	0.8669	5	0.8261	0.9311
平均 mean	5.06	0.7342	0.7989	4.69	0.7891	0.7335	4.81	0.6932	0.7275

表 5 湘西盲高原鳅 3 个群体基因型
哈迪 - 温伯格平衡的卡方检验

Tab.5 Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium of genotypes in three populations of *T. xiangxiensis*

位点 locus	群体 populations		
	2008	2009	2010
Trx1	0.382	0.318	0.420
Trx2	0.828	0.753	0.690
Trx3	0.135	0.123	0.149
Trx4	0.871	0.726	0.726
Trx5	0.664	0.604	0.626
Trx6	0.072	0.066	0.071
Trx7	0.055	0.043 *	0.061
Trx8	0.213	0.164	0.245
Trx9	0.541	0.451	0.451
Trx10	0.261	0.201	0.256
Trx11	0.557	0.429	0.613
Trx12-1	0.171	0.132	0.197
Trx12-2	0.457	0.381	0.381
Trx13	0.035 *	0.051	0.033 *
Trx14	0.937	0.852	0.781
Trx15	0.009 **	0.008 **	0.011 *

注: * 显著偏离哈迪 - 温伯格平衡; ** 极显著偏离哈迪 - 温伯格平衡。

Notes: * significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium; ** very significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium.

2.3 群体间遗传变异

利用 POPGENE 软件计算了 3 个群体的遗传距离和遗传相似系数(表 6), 结果表明 3 个群体遗传分化程度较低。

表 6 3 个湘西盲高原鳅群体间的遗传
固定指数 (F_{st} , 对角线下) 和
遗传距离 (D , 对角线上)

Tab.6 F_{st} estimates (F_{st} , below diagonal) and genetic distance (D , above diagonal) among from three populations of *T. xiangxiensis*

群体 population	2008	2009	2010
2008		0.009 5	0.003 6
2009	0.002 7		0.008 8
2010	0.085 8	0.002 2	

种群间和种群内的分子变异方差分析结果见表 7, 遗传变异大部分 (92.84%) 来自群体内, 仅有 7.16% 的变异来自于群体间, 数据表明 3 个群体处于未分化状态。

表 7 3 个湘西盲高原鳅种群间和种群内的分子变异方差分析

Tab.7 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among three populations of *T. xiangxiensis*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum square	方差组分 variance component	方差比例/% percentage of variation	P
群体间 among populations	2	45.035	0.358 77	7.16	0.004
群体内 within populations	102	584.315	1.895 43	92.84	
总变异 total variation	104	629.35	2.254 2		

3 讨论

从进化的角度看, 群体中的等位基因组成是长期进化的产物, 群体中的遗传多态性也是历史的产物。Botstein 等^[18]提出了衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标, 当 $PIC > 0.5$ 时, 该基因座为高度多态基因座, $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态基因座, $PIC < 0.25$ 时为低度多态基因座。本研究所用 16 个微卫星位点平均 PIC 值约为 0.26, 表明大部分位点具有中度多态性, 除了 2 个位点 (Trx4 和 Trx15) 达到高度多态性, 以及 2 个 (Trx7 和 Trx12-2) 为低度多态性。杂合度是评价群体遗传多样性的一个常用参数, 本研究对连续三年的样本分析结果显示, 湘西盲高原鳅的平均观测杂合度为 0.693 2 ~ 0.789 1, 相比较于其他

淡水鱼类^[19], 其遗传多样性水平较高。但是从等位基因数目上看, 在 108 尾样本中这些位点分别仅检测到 3 ~ 8 个, 等位基因数目多样性并不高。这提示各个位点的大部分等位基因具有相近的频率, 说明湘西盲高原鳅仍存在一个能够符合哈迪 - 温伯格平衡定律的群体。这可能归因于湘西盲高原鳅所居住的山洞较深, 人迹罕至而使得其群体长期不受干扰。贺刚等^[13]通过对湘西盲高原鳅 7 种同工酶分析发现湘西盲高原鳅群体的多态座位比例只有 15.38%, 认为其遗传多样性较低。以保护遗传学的观点看, 物种遗传多样性大小对物种未来长期存续至关重要^[20-21]。物种的遗传多样性是生命进化和适应的基础, 种内遗传多样性愈丰富, 物种对环境变化的适应能力愈大。种内遗传多样性的保持也有助于保持物种和整个生态

系统的多样性,减慢由于适应和进化所导致的灭绝过程。遗传的均一性和遗传多样性贫乏威胁着群体和物种的生存。当一个隔离物种数量较少时易导致物种近交衰退现象发生,而种内遗传多样性较低又降低其应对环境变化的能力^[21-23]。就目前状况看,尽管湘西盲高原鳅仍保持较高的微卫星 DNA 多样性,但由于群体所含的等位基因数目有限,一旦群体遭受破坏,偏离哈迪-温伯格平衡,其遗传多样性可能因遗传漂变而快速下降。

作为一种洞穴鱼类,湘西盲高原鳅种群遗传多样性的成因可能有:①环境较稳定导致自然选择压力变小。古生物学研究表明,大部分的洞穴鱼类是过去广为分布的地表鱼类区系的孑遗类群^[24],其祖先有可能源于偶然的地质变迁或灾害,被限制于某条地下河流或水系,在长期演化和进化过程中为了适应不断变化的环境,逐渐在形态和生活习性上发生分化,如眼的退化,皮肤色素消退等,从而相对于其地表近亲种群有较大的遗传变异。但一旦适应洞穴生活的进化完成,则又会因为长期生活在稳定的、有较强缓冲能力的洞穴环境中导致自然选择压力减小从而种群遗传突变率低^[25]。这可能是湘西盲高原鳅等位基因数量较少的一个原因。②遗传漂变影响。遗传漂变是指受随机因素的影响,某一等位基因频率在群体中出现世代传递的波动现象。在大的种群中,不同基因型个体所产生后代数的波动对基因频率不会有明显影响,其漂变速度相对较慢,可随机达到遗传平衡。但对小种群而言,遗传漂变速度会明显加快,常常在几代甚至一代后即可导致某些等位基因的消失或另一些等位基因的固定,从而最终改变群体的遗传结构和多样性水平,从而加剧群体间的变异^[26]。湘西盲高原鳅可能仍有较大的群体而维持等位基因频率的平衡。

当一个物种处于 Hardy-Weinberg 平衡状态时,其基因频率及基因型频率保持不变。导致物种偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因有:群体小、近亲交配、等位基因突变、无效等位基因、动物迁徙等^[27]。本研究的结果显示,3 个种群在部分位点上严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡,存在显著和极显著现象,这可能在一些个体中存在无效等位基因,或者因分型实验的分辨率所限,未能正确检测出一些等位基因,有待进一步分析。

乌龙山溶洞群景区现已发现的大小溶洞有

212 个,其中飞虎洞位于湘西自治州龙山县乌龙山大峡谷中部,因其极大的科学考察价值中法联合科学考察队于 1993 年、湖南省于 2002 年均组织过相关探险考察,生物学家曾在洞内发现许多珍贵的洞穴动物,但因洞穴实在过于庞大,目前为止离完全探察清楚尚相距遥远,也没有探明该洞有哪些出口。通过对来自 3 个不同溶洞的 3 个湘西盲高原鳅群体的微卫星座位数据分析发现其遗传分化程度较低,基本处于未分化状态,这可能间接表明这 3 个溶洞有地下暗河相通。

洞穴动物是研究遗传、系统进化与动物地理方面的好材料^[28],在科研上有极高的价值。鱼类和洞穴共同演化至少有上万年的历史,由于洞穴鱼类长期适应于洞穴环境,对洞穴环境产生了较强的依赖性^[4]。本研究又表明湘西盲高原鳅的遗传多样性较低,因而其对环境改变的适应能力较低,而洞穴环境十分脆弱,对各种生态因子如温度、声音、光线和化学物质等的变化极为敏感,人类对洞穴的各种开发,由于洞内外物质和能量的交换,极易促进洞穴内生态环境的改变^[29],进而威胁着种群数量本来就较少的洞穴鱼类的生存,很多洞穴鱼类数量已大为减少甚至几乎绝迹。湘西盲高原鳅所在的洞穴位于乌龙山大峡谷风景区,随着旅游的逐渐开发,其种群减小以致最终消亡的风险也不断增加,因此开展针对性保护工作已刻不容缓。

参考文献:

- [1] 杨干荣,袁凤霞,廖荣谋. 中国鳅科鱼类一新种——湘西盲条鳅[J]. 华中农业大学学报,1986,5(3):219-223.
- [2] 陈银瑞,徐国才. 云南石林盲高原鳅的发现及其分类地位的讨论[J]. 动物学研究,1992,13(1):17-23.
- [3] 何力,王雪光,陈清纯,等. 湘西盲高原鳅的形态特征描述[J]. 淡水渔业,2006,36(4):56-58.
- [4] 张晓杰,代应贵. 我国喀斯特洞穴鱼类研究进展[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(3):364-371.
- [5] Jeffery W R. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology [J]. *Developmental Biology*,2001,231(1):1-12.
- [6] 何德奎,陈咏霞,陈毅峰. 高原鳅 *Triptophysa* 鱼类的分子系统发育和生物地理学研究[J]. 自然科学进展,2006,16(11):1359-1404.
- [7] Hausdorf B, Wilkens H, Strecker U. Population

- genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2011, 60(1):89-97.
- [8] Borowsky R, Wilkens H. Mapping a cave fish genome polygenic systems and regressive evolution [J]. *Journal of Heredity*, 2002, 93(1):19-21.
- [9] Yamamoto Y, Stock D W, Jeffery W R. Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish [J]. *Nature*, 2004, 431(7010):844-847.
- [10] Kruckenhauser L, Haring E, Seemann R, *et al.* Genetic differentiation between cave and surface dwelling populations of *Garra barreimiae* (Cyprinidae) in Oman [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11(1):172-186.
- [11] Protas M E, Hersey C, Kochanek D, *et al.* Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(1):107-111.
- [12] Li Z, Gan X, He S. Distinct evolutionary patterns between two duplicated color vision genes within cyprinid fishes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2009, 69(4):346-359.
- [13] 贺刚, 何力, 许映芳, 等. 湘西盲高原鳅群体同工酶分析 [J]. *生态学杂志*, 2009, 28(10):2037-2041.
- [14] 张天时, 刘萍, 李健, 等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究 [J]. *水产学报*, 2005, 29(1):6-12.
- [15] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22):4692-4693.
- [16] 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记 [J]. *水产学报*, 2005, 29(4):482-486.
- [17] Zane L, Bargelloni L, Patamello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1):1-16.
- [18] Botstein D, White R L. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Animal Genetics*, 1980, 32(3):314-331.
- [19] Dewoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals [J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(3):461-473.
- [20] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to conservation genetics* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [21] Frankham R. Genetics and extinction (Review) [J]. *Biological Conservation*, 2005, 126(2):131-140.
- [22] Keller L F, Arcese P, Smith J N M, *et al.* Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck [J]. *Nature*, 1994, 372:356-357.
- [23] Frankham R, Kingslover J G. Response to environmental change: adaptation or extinction [M] // Ferrier R, Dieckman U, Couvet D, Eds. *Evolutionary conservation biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004:85-100.
- [24] Barr T C, Holsinger J R. Speciation in cave faunas [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1985, 16:313-337.
- [25] Avise J C, Selander R K. Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax* [J]. *Evolution*, 1972, 26(1):1-19.
- [26] Freeland J R. Genetic Analysis of Single Populations [M] // Freeland J R, Eds. *Molecular ecology*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2005:63-109.
- [27] Hartl D L, Clark A G. Organization of genetic variation [M] // Hartl D L, Clark A G. *Principles of population genetics*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1997:74-110.
- [28] 陈海峰, 李枢强. 丰富多样的洞穴动物 [J]. *动物学杂志*, 2004, 39(1):59.
- [29] 宋林华. 喀斯特地貌研究进展与趋势 [J]. *地理科学进展*, 2000, 19(3):193-202.

Microsatellite analysis of population genetic diversity in *Triplophysa xiangxiensis*

YAO Yanhong^{1,2}, KONG Lingfu³, WANG Dengqiang¹, HE Wenhui⁴, HE Li¹, YU Laining^{1,2*}

(1. Yangze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The cavefish *Triplophysa xiangxiensis* is a species of loach belonging to family Cobitidae, order Cypriniformes. It is endemic to Longshan County of western Hunan Province of China. In this study, a total of 103 individuals from three *T. xiangxiensis* populations obtained from three caves in Wulongshan Mountain were studied using 16 pairs of microsatellite markers. Using polymorphism information content (PIC), mean heterozygosity (H), number of effective alleles and F -statistics, the genetic diversity and genetic differentiation were evaluated. A total of 83 different alleles were detected in all examined loci. The number of alleles ranged from 3 to 8, with an average number of about 5 per locus. The observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.362 5 to 0.946 5 and from 0.538 6 to 0.906 5, respectively. The polymorphism information content for these three populations were 0.263 2, 0.231 3, 0.303 5. The results from this study indicated that two of the selected 16 microsatellite loci were high polymorphic and two loci were low polymorphic, the other twelve microsatellite loci showed moderate polymorphic. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that almost majority of the variance in the *T. xiangxiensis* was within stocks (92.84%), and 7.16% was among stocks. The result of AMOVA, F -statistics, Nei's genetic distance and genetic identity indicated that genetic difference was relatively small and genetic differentiation was low, with high genetic identity between both populations. The information obtained in this study will contribute to the conservation of this endangered *T. xiangxiensis* species.

Key words: *Triplophysa xiangxiensis*; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: YU Laining. E-mail: yulaininghb@gmail.com