

我国泥鳅微卫星遗传多样性初步分析

丁海燕¹, 朱明^{2,3}, 彭冲¹, 林根妹¹, 汤志宏¹,
王亚梅¹, 杨官品^{1*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005;

3. 连云港龙源生物科技有限公司, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为有效管理和合理利用我国的泥鳅资源, 用6个微卫星标记分析了安徽(AH)、甘肃(GS)、广东(GD)、广西(GX)、黑龙江(HLJ)、江苏(JS)和重庆(CQ)7个泥鳅群体的遗传多样性。6个微卫星摘自泥鳅微卫星连锁图谱, 不存在连锁不平衡, 在HLJ群体中处于哈代-温伯格平衡, 适用遗传多样性分析。结果发现, 6个微卫星共检测到69个等位基因, 每位点7~16个, 有效等位基因数(N_e)3.0~5.5个, 观察杂合度为0.202~0.408, 期望杂合度为0.673~0.820, 揭示的多样性信息含量(PIC)在0.643~0.796。研究表明, 7个泥鳅群体遗传多样性丰富。群体间遗传分化系数(F_{st})达到0.499, 49.9%的变异可归于群体间差异, 而 F_{is} 在0.167~0.421, 表明泥鳅群体存在较明显的近交或斑块化分布。聚类分析显示AH、GD、HLJ和JS聚成一个分支, 而CQ、GS和GX聚为另一个分支。研究表明我国泥鳅呈现东西向梯度分布并在南北向可能存在扰动。

关键词: 泥鳅; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q 785; S 966.4

文献标志码: A

鳅属鱼类(*Misgurnus*)栖息于平静或缓流、浅且有泥底的淡水水体, 如池塘、湖泊等, 喜钻泥, 耐低氧, 能直接吞空气辅助呼吸。鳅属鱼类隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鳅科(Cobitidae)、花鳅亚科(Cobitinae), 广泛分布于欧亚大陆、大巽他群岛和非洲摩洛哥等地^[1]。鳅属鱼类地理分布有明显区域性, 如亚洲的中国、韩国和日本; 西亚土耳其; 欧洲的希腊和西班牙。除西藏自治区和云南外, 我国不同河流和湖泊、大小沟渠和池塘、稻田等水域都有鳅属鱼类分布。我国鳅属鱼类主要有北方泥鳅(*M. bipartitus*)、黑龙江泥鳅(*M. mohoity*)和泥鳅(*M. anguillicaudatus*)3种。北方泥鳅主要栖息在黄河以北地区, 黑龙江泥鳅主要栖息在黑龙江水系, 而泥鳅在我国各地均有分布。我国鳅属鱼类形态十分相近, 可相互杂交, 杂交后代可育, 无生殖隔离(苗种繁育观察)。本研究还

发现微卫星标记通用性非常高, 据此, 认为我国鳅属鱼类可能是不同生态类型, 并将收集的样品统归为泥鳅进行多样性分析。

泥鳅近年来已形成规模养殖和国内外消费市场, 但我国对泥鳅遗传多样性和群落结构少有研究。我国泥鳅栖息环境受人类活动影响越来越多, 污染、河道筑坝等影响泥鳅自然分布。天然苗异地养殖、异地亲鱼育苗、养殖个体逃逸等干扰了泥鳅群落结构和分布模式。因此, 客观描述我国泥鳅遗传多样性和群落结构, 是有效管控和合理利用我国泥鳅资源的需要。遗传多样性研究是避免物种灭绝、遗传多样性丧失、生态系统功能弱化或崩溃等重大的需要, 遗传多样性的丰富程度不仅关乎生物的适应进化, 而且是遗传改良和生物多样性保护的基础^[2]。

微卫星(microsatellite)是共显性标记, 变异丰

收稿日期: 2015-04-08

修回日期: 2015-05-28

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(13)2041]; 江苏省农业科技支撑项目(BE2014335)

通信作者: 杨官品, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

富,基因组分布广泛,分型容易,被广泛用于生命科学和医学研究领域^[3-4],包括水产动物遗传多样性分析和群体遗传结构解析^[5-8]。有关泥鳅遗传多样性和群落结构的研究包括泥鳅隐系甄别^[9]、遗传多样性分析^[10-11]、日本四国岛泥鳅起源^[12]、日本佐渡岛泥鳅遗传结构^[13]、韩国濒危短纹后鳍花鳅分化^[14]、东欧大草原残遗种保护区沙鳅系统地理结构、欧洲康斯坦茨湖须鳅种群遗传结构^[15-16]、我国长江流域、鄱阳湖区等水体泥鳅种群遗传多样性等^[17-18]。一些研究已用到微卫星分析^[19-20]。本研究用 6 个微卫星研究了黑龙江、黄河、长江和珠江四大流域 7 个二倍体泥鳅群体的遗传多样性,以期为我国泥鳅资源有效管理和合理利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 取样和引物设计

泥鳅样品取自我国 7 个区域,包括安徽(AH)、甘肃(GS)、广东(GD)、广西(GX)、黑龙江(HLJ)、江苏(JS)和重庆(CQ)。取样地散布黑龙江、黄河、长江、珠江四大流域,跨越一个海拔梯级。泥鳅耐低氧,若取样地离青岛较近,就活体运回实验室,剪取尾部(少许肌肉组织和尾鳍),置于 70% 酒精和 50 mmol/L EDTA, pH 8.0,室温保存 1 d,转置 -20 °C 保存。若取样地遥远,就野外剪取尾部,置 70% 酒精和 50 mmol/L EDTA, pH 8.0 室温保存 1~2 d,视样品多少可更换保存液,然后倒掉保存液,乘公共交通工具运回实验室。6 个微卫星摘自泥鳅微卫星连锁图谱^[21],但基于序列重新设计,引物长度 18~25 碱基,尽可能 20 碱基,扩增片段长度 100%~300 bp,便于电泳分型,GC 含量 40%~60%,复性温度 55%~65 °C^[22]。共设计了 40 多对引物,为满足等位基因 10 个左右,电泳分型容易,无缺失等位基因,等位基因频率分布均匀,取样易达饱和等条件,最终选择这 6 个微卫星用于分析。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和基因型分型

剪取少量尾鳍,置液氮中磨成粉,用蛋白酶 K 消解—苯酚氯仿抽提法提取基因组 DNA^[23],溶于双蒸水,并将浓度调到约 20 ng/μL 备用。PCR 扩增体系(25 μL)含有 50 ng 模板 DNA, 200 nmol 引物(每引物),50 μmol dNTP(每种), 1.5 mmol Mg²⁺, 1 × 缓冲液和 1 单位 *Taq* DNA 聚

合酶(TaKaRa)。热循环条件为 94 °C 预变性 3 min,接 94 °C 变性 1 min,55 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min 30 个循环,再在 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物保存于 4 °C。PCR 产物经 1 900 V PAGE 分离,银染显示等位基因,分型个体^[24]。

表 1 泥鳅样品来源地信息

Tab. 1 Locations of 7 loach (*M. anguillicaudatus*) populations

流域 river	政区 administrative area	政区名简写 abbreviation	群体大小 no. of individuals
黑龙江 Heilongjiang River	黑龙江	HLJ	40
黄河 Yellow River	甘肃	GS	40
长江 Yangtze River	重庆	CQ	40
	安徽	AH	40
	江苏	JS	37
珠江 Pearl River	广西	GX	40
	广东	GD	40

1.3 数据分析

除二倍体外,泥鳅偶有多倍体出现。分析时,删除一个微卫星存在多于两个等位基因的个体。用 Popgen 32 (<http://www.seekbio.com/Download>) 和 Genepop (<http://genepop.curtin.edu.au/>),在线计算等位基因频率、观察等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观察杂合度(H_o)和群体间 Nei 氏遗传距离(GD)^[25],检验哈代-温伯格平衡(HWE)。用 PIC _ CALC 0.6 (<http://hi.baidu.com/luansheng1229/item/306815126d58e3a4feded5a4>) 计算多样性信息指数(PIC)。用公式 $D = (H_o - H_e) / H_e$ 计算遗传偏离系数(D)^[26]。用 UPGMA 方法和 MEGA 6.0 (<http://Proteh.bsd.uchicago.edu/software.html>) 进行聚类分析。用 STRUCTURE 1 (<http://proteh.bsd.uchicago.edu/software.html>) 推导最可能自由交配组数。

2 结果

2.1 遗传多样性

HLJ 群体可能受到的人为干扰非常小,6 个微卫星至少在 HLJ 群体处于哈代-温伯格平衡(HWE)平衡,这些标记来源连锁图谱不存在连锁不平衡。另外,这些微卫星标记扩增容易、分型清晰。

表 2 本研究使用的微卫星及其相关信息
Tab.2 Microsatellites used in this study and their associated information

座位 locus	等位基因长度 / bp Length of alleles	引物 primer (5' - 3')	复性温度/℃ Tm	序列号 accession no.
Mac103	259 ~ 273	F:GAACACTGACAGCAGCCAAA R:GGACTGTGCGAGTGTGAAAA	53.8	AB303436
Mac119	114 ~ 186	F:TTGCATTTCGGCAATGTTTTA R:ATCAGCTTAGCCTCCCCACT	55.9	AB303440
Mac164	279 ~ 293	F:CTTACTGCCACAGCAGACAGA R:TCTGCGGATGACAGAACTG	55.4	AB303450
Mac190	226 ~ 256	F:CACTGCAACAAGCATTGCATA R:TTTTACCCCAAATGGATCA	55.4	AB303455
Mac539	195 ~ 205	F:TGAATGTGCAAGAGCTGT R:GTATGAGCTGGGCTTTGG	52.9	AB303587
Mac678	206 ~ 220	F:AGACGCACATGCTTCTTACC R:GATACAGCACCTCCCATTCC	54.8	AB303440

全部样品中,6 个微卫星位点上共存在 69 个等位基因,各位点等位基因数为 7 ~ 16,平均 11.5 个,Mac103 存在最多等位基因(16 个),而 Mac678 等位基因数最少(7 个)。安徽群体(AH)存在最多等位基因(34 个)。各群体观察杂合度为 0.402 ~ 0.136,平均 0.297;期望杂合度为 0.630 ~ 0.165,平均 0.418。 PIC 为 0.643 ~

0.796,平均 0.738,表明泥鳅群体遗传多样性较高。Botstein 等^[27]指出当一个基因位点的 $PIC < 0.25$ 时,该位点为低度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态位点; $PIC > 0.5$ 时为高度多态位点。6 个微卫星位点的 PIC 均大于 0.5。因此,6 个微卫星位点均为高度多态位点,群体遗传多样性丰富(表 3)。

表 3 总样本微卫星遗传多样性
Tab.3 The genetic diversity of the total samples at 6 microsatellites each

座位 locus	第一等位基因 1st richest allele	第二等位基因 2nd richest alleles	等位基因数 no. of alleles	多样性信息指数 PIC	遗传偏离系数 D
Mac119	0.373	0.138	13	0.781	-0.656
Mac563	0.397	0.197	12	0.750	-0.739
Mac103	0.302	0.254	16	0.763	-0.486
Mac164	0.303	0.176	10	0.796	-0.691
Mac539	0.529	0.162	11	0.643	-0.610
Mac678	0.367	0.268	7	0.697	-0.499

2.2 群体分化

稳定系数(fixation indexes) F_{st} 和 F_{is} 分别揭示群体间遗传分化程度和总样本杂合子缺失或过剩状态。按照 Balloux 等^[28]的标准,0 ~ 0.05、0.05 ~ 0.15、0.15 ~ 0.25 分别是低、中、高遗传分化,本实验的平均 F_{st} 达到 0.499(表 4),表明群体间遗传分化水平极高。这样的遗传分化亦体现在各个微卫星位点上,最低 0.387(Mac678),最高

0.586(Mac563)。 F_{is} 在 0.167(Mac103)和 0.421(Mac563)之间变化,但都大于零,杂合子严重缺失,表明群体内近交现象严重。或许这是人类活动(如农业生产、大小水域隔离等)导致的遗传资源分布逐步斑块化的结果,值得深入研究。杂合子缺失也反映在遗传偏离系数(D)上(表 3)。 D 远小于零,杂合子缺失严重。

无偏 Nei 氏遗传距离构建的 UPGMA 和 NJ

系统树表明,HLJ、GD、JS 和 AH 群体聚为一个分支,而 GX、GS 和 CQ 群体聚为一个分支,这说明我国泥鳅遗传资源呈现一定的地势梯级分割,梯级上下分化显著(图 1)。两种系统树树形略有不同,但 HLJ 群体处在分支底层,其他群体逐步融入。这表明 HLJ 可能是遗传多样性丰富区域。

四大流域并未呈现南北地理位置聚类顺序。即使是四大流域东部盆地地区,南北顺序也不显著,至少 UPGMA 系统树没有呈现地理顺序。这说明人类活动或现有养殖行为可能在一定程度上扰动了泥鳅遗传资源分布。不过,两个系统树树形不完全一致,NJ 系统树仍显现南北地理群体依次聚类的特点。

7 个泥鳅群体间遗传距离差别较大。其中,HLJ 和 GS 间遗传距离最大(4.719),其次为 JS 和 GS 间(3.213)和 AH 和 GS 间(3.117)。GX 和 HLJ 间群体(2.603)、AH 和 CQ 间(2.412)、

GD 和 GS 间(2.268)、GX 和 JS 间(2.243)、CQ 和 HLJ 间(2.220)、CQ 和 JS 间(2.083)的遗传距离介于 2 和 3,其余群体间的遗传距离均小于 2。GD 和 HLJ 间的遗传距离最小(0.272)。各群体间平均遗传距离为 1.695。

表 4 6 个微卫星位点的稳定系数
Tab. 4 Fixation indexes of 6 microsatellites

遗传座位 locus	F_{is}	F_{st}
Mac119	0.248	0.579
Mac563	0.421	0.586
Mac103	0.167	0.418
Mac164	0.336	0.570
Mac539	0.335	0.456
Mac678	0.234	0.387
Mean	0.290	0.499

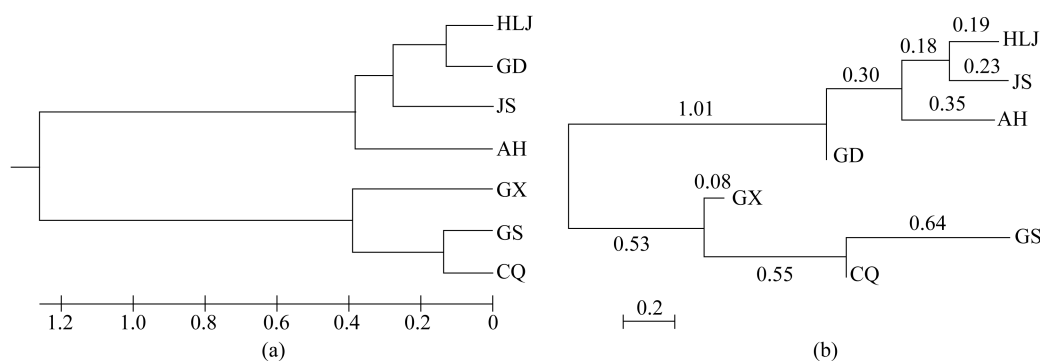


图 1 基于无偏 Nei 氏遗传距离的 UPGMA (a) 和 NJ (b) 树

Fig. 1 UPGMA (a) and NJ (b) dendrograms of 7 *M. anguillicaudatus* populations

2.3 HLJ 和 JS 群体结构比较

两个系统树都显示 HLJ 和 JS 两个群体存在关联。AH 和 GD 两个群体与 HLJ 的关联与 JS 与 HLJ 的关联类似。STRUCTURE 分配分析表明,当 $K=2$ 时, ΔK 可取最大值(图 2-a),HLJ 和 JS 两群体的个体可以明确分为两组。15.2% 的 HLJ 个体和 95.9% 的 JS 个体进入分组 1,84.8% 的 HLJ 个体和 4.1% 的 JS 个体进入分组 2(图 2-b),HLJ 群体只混杂极少数 JS 群体的个体,而 JS 群体里存在大量 HLJ 群体的个体(图 2-c)。江苏泥鳅养殖业较发达,育苗时可能用 HLJ 泥鳅作父本。这人为弱化了两群体地理隔离,扰动了泥鳅自然资源分布模式。

3 讨论

本实验用 6 个微卫星分析我国 7 个泥鳅地理群体的遗传多样性,发现我国泥鳅遗传多样性丰富,且东西地理梯级两侧分化显著,南北群体间可能存在一定的扰动。这些认知将有助于合理管理和适度利用我国泥鳅资源。遗传多样性研究合理取样不易,本实验仅涉及 7 个地理群体,尚属初步研究。相比其他鱼种,泥鳅养殖规模有限,遗传资源人为干扰还较少,宜尽早开展遗传资源调查和遗传多样性分析,以实现资源的科学管理和合理利用。

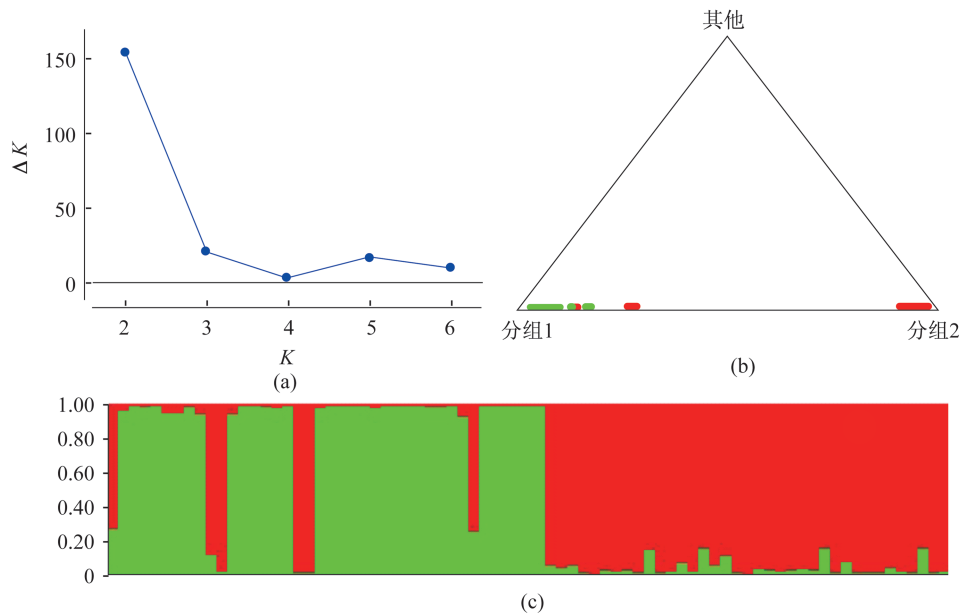


图2 黑龙江和江苏两个泥鳅群体分配分析

(a) K 值与统计量 ΔK 的关系; (b) HLJ 和 JS 个体分配三角聚类图; (c) HLJ 和 JS 个体分配。红色代表 HLJ 个体, 绿色代表 JS 群体。

Fig. 2 Distribution of the individuals in HLJ and JS populations

(a) the relationship between K value and ΔK statistics; (b) triangle with individuals of HLJ (red) and JS (green) at the corners; (c) distribution of the individuals in HLJ and JS, respectively.

F_{is} 可揭示杂合子是否过剩, 所用微卫星的 F_{is} 在 0.167 和 0.421 之间变化, 远高于零, 这反映群体内存在较多近交, 可能的原因是人类活动干扰了泥鳅分布, 如农业生产、大小水体零散分布可能使泥鳅遗传资源分布斑块化, 群体间分化严重 ($F_{st} = 0.499$)。Shan 等^[18] 发现长江中下游泥鳅 4 群体 F_{st} 达到 0.2, 而 Khan 等^[29] 发现 44 个日本泥鳅群体 F_{st} 达到 0.774 (同工酶标记), 这些都佐证泥鳅群体间遗传分化严重。不过, 这也为泥鳅杂交育种、杂种优势利用提供了很好的资源基础。很多原因可导致泥鳅遗传分化严重, 但我们认为人类活动导致的基因漂变可能是最主要原因。

尽管聚类分析将 7 个泥鳅群体分成了两个组, 与东西向第一个地势梯级相符, 但四大流域东部盆地各群体遗传距离却与地理距离没有明确的关联性。Shan 等^[18] 对长江中下游泥鳅和 Khan 等^[29] 对日本泥鳅遗传多样性研究也获得相似的认知, 也不排除是群体个体数所导致, 因此, 后续相关研究应当加大群体样本。

Barker^[30] 指出, 每群体 25 个体以上可满足微卫星遗传多样性分析。本实验每群体取样 40 个左右个体, 符合取样要求。研究发现, HLJ 群体遗传多样性丰富, 人类活动干扰小。基于这一较理想群体进行哈代-温伯格检验, 发现 6 个微卫星均处于 HW 平衡状态。另外这些微卫星间隔摘自泥鳅微卫星连锁图谱, 肯定不存在紧密连锁关系, 从而更适用于遗传多样性分析^[31]。除了容易电泳分型, 等位基因数适中、分布均匀也是选取微卫星标记的要素。等位基因太多不易区分, 且取样难以饱和。本实验发现, 6 个微卫星位点上的等位基因中没有只出现 1 次的情形, 群体大小适合。本实验只涉及 7 个泥鳅地理群体, 能获得的认知有限, 但测定了 6 个微卫星位点检测到的所有等位基因的序列, 列出了微卫星位点所有等位基因在 7 个群体中的频率, 也给出了各群体个体数 (图 3, 表 5)。这使本实验获得的数据成为开放性数据, 便于不同研究者、不同时间数据的整合和再分析 (meta-analysis)。

表 5 微卫星等位基因及频率

Tab. 5 Alleles and their frequencies at 6 microsatellite loci in 7 loach populations

座位 locus	等位基因 allele	群体 population (个体数 no. of individuals)						
		HLJ(40)	GS(40)	CQ(40)	AH(40)	JS(37)	GX(40)	GD(40)
Mac119	A		0.075					
	B						0.163	
	C			0.013				
	D				0.865		0.013	
	E	1.000		0.128		0.903		0.625
	F		0.038		0.041	0.014	0.500	
	G			0.308	0.081	0.083	0.313	
	H			0.167				
	I			0.385	0.016		0.013	
	J		0.888					0.042
	K							0.139
	L							0.111
	M							0.083
Mac563	A		0.075				0.692	
	B			0.176				
	C		0.888	0.346			0.064	
	D						0.064	
	E		0.038	0.462			0.039	
	F					0.052	0.141	
	G	0.026						
	H	0.013						0.081
	I					0.741		
	J	0.921		0.013	1.000	0.207		0.608
	K	0.026						0.257
	L	0.013						0.054
Mac103	A			0.013				
	B						0.0125	
	C					0.014		
	D		0.103					
	E	0.811			0.013	0.297	0.125	0.577
	F		0.103	0.013	0.463	0.662	0.050	
	G	0.135			0.438	0.014	0.225	0.051
	H	0.014	0.154		0.013	0.014	0.063	
	I		0.641	0.950	0.038		0.436	
	J			0.025	0.016		0.025	
	K	0.041			0.025		0.025	0.167
	L						0.025	
	M						0.013	0.013
	N							0.026
	O							0.154
	P							0.013
Mac164	A					0.044		
	B	0.433			0.025	0.250		
	C	0.267			0.150	0.250		0.025
	D	0.217			0.350	0.221		
	E	0.083			0.325	0.191		0.613
	F				0.075	0.029		
	G					0.015		
	H		1.000	0.988	0.013			
	I				0.063		1.000	0.075
	J			0.013				0.288
Mac539	A	0.030	1.000	1.000	0.057	0.078	0.988	0.308
	B						0.013	
	C				0.071			
	D	0.121			0.086	0.063		0.231
	E	0.546			0.357			0.295
	F				0.100	0.156		
	G				0.143	0.188		0.077
	H	0.288				0.517		0.090
	I				0.057			
	J	0.015			0.014			
	K				0.114			

续表 1

座位 locus	等位基因 allele	群体 population (个体数 no. of individuals)						
		HLJ(40)	GS(40)	CQ(40)	AH(40)	JS(37)	GX(40)	GD(40)
Mac678	A			0.046	0.013		0.350	
	B	0.463	0.013	0.136	0.813	0.721	0.213	0.225
	C		0.988	0.439	0.025		0.413	
	D	0.463		0.379	0.113	0.265		0.325
	E	0.038						0.363
	F				0.013	0.015		
	G	0.038			0.025		0.025	0.088

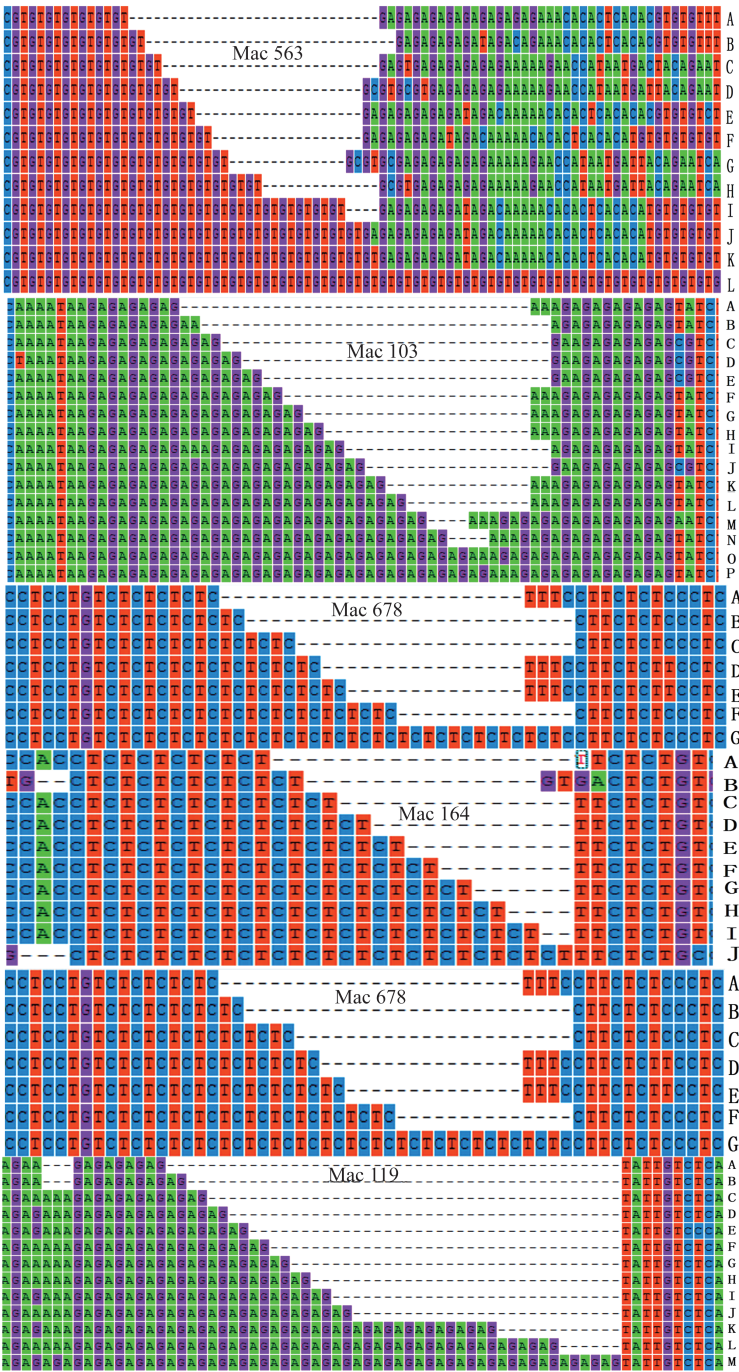


图 3 6 个微卫星位点的核心序列

Fig.3 The motifs of the 6 microsatellites used in this study

参考文献:

- [1] Chen J X. A study on the classification of the botoid fishes of China [J]. Zoological Research, 1980, 1(1):3-25.
- [2] Pan Y, Zhao GF. Estimation of genetic diversity at molecular level [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 1997, 18(4):645-653.
- [3] Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [J]. Aquaculture, 2006, 255(1):1-29.
- [4] Song C N, Li J, Liu P, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity in 4 wild populations of *Charybdis japonica* [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7):985-991.
- [5] Zhang C, Tong G X, Kuang Y Y, et al. Study on the genetic diversity of the conservation population in Taimen [J]. Acta Agriculturae Bioeali-Sinica, 2013, 28 (suppl.):113-119. [张超, 佟广香, 匡友谊, 等. 哲罗鱼保种群体遗传多样性及保种策略研究. 华北农学报(增刊), 2013, 28(S1):113-119.]
- [6] Zhang K, Wang WJ, Li WY, et al. Analysis of genetic diversity and differentiation of seven stocks of *Litopenaeus vannamei* using microsatellite markers [J]. Journal of Ocean University of China, 2014, 13(4):647-656.
- [7] Li Q, Yu H, Yu R. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China [J]. Aquaculture, 2006, 259(1):95-102.
- [8] Sun G L, Díaz O, Salomon B, et al. Genetic diversity and structure in a natural *Elymus caninus* population from Denmark based on microsatellite and isozyme analyses [J]. Plant Systematics and Evolution, 2001, 227(3-4):235-244.
- [9] Morishima K, Nakamura - Shiohawa Y, Bando E, et al. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *M. anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses [J]. Genetica, 2008, 132(2):159-171.
- [10] Chang Z J, Zhou RX, Yu QX. Genetic variation of two loach species revealed by RAPD analysis [J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(1):89-93. [常重杰, 周荣家, 余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析. 动物学报, 2001, 47(1):89-93.]
- [11] Long L Q, Tang B G, Zhao Z S, et al. RAPD analysis on nature population of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryamus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1998, 17(6):566-569. [龙良启, 汤宝贵, 赵振山, 等. 泥鳅与大鳞副泥鳅群体 RAPD 分析. 华中农业大学学报, 1998, 17(6):566-569.]
- [12] Shimizu T. Geographic variation of the Japanese spinous loach, *Cobitis takatsuensis* inferred from allozyme analysis [J]. Folia Biologica, 2003, 51 (suppl.):85-92.
- [13] Kano Y, Watanabe K, Nishida S, et al. Population genetic structure, diversity and stocking effect of the oriental weatherloach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in an isolated island [J]. Environ Biol Fish, 2011, 90:211-222.
- [14] Kim D, Conway K W, Jeon H B, et al. High genetic diversity within the morphologically conservative dwarf loach, *Kichulchoia brevifasciata* (Teleostei: Cobitidae), an endangered freshwater fish from South Korea [J]. Conserv Genet, 2013, 14:757-769.
- [15] Mark A C, Karel J, Alicja B, et al. European colonization by the spined loach (*Cobitis taenia*) from Ponto-Caspian refugia based on mitochondrial DNA variation [J]. Molecular Ecology, 2006, 15(1):173-190.
- [16] Marta B, Axel M. Old fish in a young lake: stone loach (Pisces: *Barbatula barbatula*) populations in Lake Constance are genetically isolated by distance [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(4):1229-1239.
- [17] Zeng L G, Zhang W, Gan Y F, et al. The genetic diversity of loach *Misgurnus anguillicaudatus* from the Poyang Lake [J]. Acta Hydrobiol Sinica, 2010, 34(5):966-972. [曾柳根, 张伟, 甘云飞, 等. 鄱阳湖区泥鳅遗传多样性研究. 水生生物学报, 2010, 34(5):966-972.]
- [18] Shan L, Wei K J, Zhang G R. Genetic diversity of four diploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) populations in the middle and lower Yangtze River Basin [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2009(4):453-458.
- [19] Yu J N, Kim B J, Yun Y E, et al. Characterization of 11 novel polymorphic microsatellite loci in the threatened Korean *M. anguillicaudatus*, *Iksookimia koreensis*, isolated using a next-generation sequencing method [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 56:132-137.
- [20] Li Y J, Yu Z, Zhang MZ, et al. Genetic diversity in Chinese *M. anguillicaudatus* species analyzed by

- microsatellite DNA markers[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(12): 75 – 79. [李雅娟, 于卓, 张明昭, 等. 我国三种野生泥鳅遗传多样性的微卫星分析. 东北农业大学学报, 2011, 41(12): 75 – 79.]
- [21] Morishima K, Nakayama I, Arai K. Genetic linkage map of the loach *M. anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) [J]. Genetica, 2008, 132(3): 227 – 241.
- [22] Chen D, Li Q, Kong L. Development and characterization of 47 genic microsatellite markers of the loach, *M. anguillicaudatus* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(1): 163 – 167.
- [23] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989: 463 – 470.
- [24] Jiang X, Yang G P, Wei Q W, et al. Analysis of the genetic structure of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) inhabiting the Chinese coast [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(2): 271 – 274. [江鑫, 杨官品, 危起伟, 等. 中国沿海花鲈群体遗传结构分析. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(2): 271 – 274.]
- [25] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89(3): 583 – 590.
- [26] Xiong M H, Shi F, Xu N, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Spinibarbus sinensis* (Bleeker) [J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(1): 40 – 44. [熊美华, 史方, 徐念, 等. 中华倒刺鲃微卫星标记筛选及特征分析. 水生生态学杂志, 2011, 32(1): 40 – 44.]
- [27] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314 – 331.
- [28] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 155 – 165.
- [29] Khan M, Arai K A. Allozyme variation and genetic differentiation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Fisheries Science, 2000, 66(2): 211 – 222.
- [30] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds [C]. Proceedings of The 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Canada: Guelph and Ontario, 1994.
- [31] Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(1): 17 – 26.

Preliminary analysis of the microsatellite diversity of Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)

DING Haiyan¹, ZHU Ming^{2,3}, PENG Chong¹, LIN Genmei¹, TANG Zhihong¹,
WANG Yamei¹, YANG Guanpin^{1*}

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Oceanography, Huaihai College of Technology, Lianyungang 222005, China;

3. Longyuan BioTech Co. Ltd., Lianyungang 222005, China)

Abstract: In order to manage and exploit the loach genetic resources of China, six microsatellites were used to describe the genetic diversity of 7 Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) populations inhabiting Anhui (AH), Gansu (GS), Guangdong (GD), Guangxi (GX), Heilongjiang (HLJ) and Jiangsu (JS) Provinces and Chongqing (CQ) City, respectively. The 6 polymorphic microsatellites were selected from the microsatellite linkage map of loach, being not linked with each other. They were also found to be in Hardy – Weinberg equilibrium in HLJ population, a less disturbed population, thus being suitable for diversity determination. The 6 microsatellites revealed the polymorphism information content (PIC) ranging from 0.643 to 0.796 among populations. In total, 69 alleles were identified, and the number of alleles (N_a) varied between 7 and 16, and the effective alleles (N_e) varied between 3.0 and 5.5. The observed heterozygosity (H_o) among populations ranged from 0.202 to 0.408 while the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.673 to 0.820. These findings indicated that 7 populations were rich in genetic diversity. The co-efficiency of gene differentiation among populations (F_{st}) was 0.499, illustrating that 49.9% of the total variation can be explained by the differentiation among populations. The F_{is} ranged from 0.167 to 0.421, indicating that serious inbreeding and further uneven distribution exist within populations. The cluster analysis showed that AH, GD, HLJ and JS populations merged into a clade while CQ, GS and GX fused into the other, indicating that the diversity of Chinese loach may have west-east differentiated and may have been north-south disturbed.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: YANG Guanpin. E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn