

doi: 10.7541/2021.2019.253

澜沧江中上游光唇裂腹鱼四个地理群体遗传多样性分析

金方彭 李光华 冷云 吴俊颀 左鹏翔 雷春云

(云南省渔业科学研究院, 昆明 650111)

摘要: 利用简化基因组测序对澜沧江中上游的苗尾-功果桥库区、黄登-大华桥库区、里底江段和乌弄龙江段4个地理群体60个光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatu* Tsao)样本进行了简化基因组测序, 平均测序深度255.26X, Q30为94.96%, 平均GC含量为39.80%; 测序获得多态性SLAF标签252623个, SNP标记1151083个, 其中, SNP平均完整度为36.66%, SNP平均杂合率为9.5%; 通过测序结果进行遗传多样性分析, 结果表明, 观测等位基因数均为2, 平均期望等位基因数为1.4211—1.5029, 平均观测杂合度为0.2381—0.3131, 平均期望杂合度为0.2690—0.3115, 平均多样性指数为0.2868—0.3248, 平均香浓指数为0.4269—0.481, 平均次要基因频率(MAF)为0.1854—0.2216, 平均多态信息含量(PIC)为0.2237—0.2553; AMOVA分析结果显示, 在总的变异中, 89.73%的遗传变异来自群体内部, 10.27%的遗传变异来自于群体间, 群体间遗传分化指数在-0.0150—0.1299($P < 0.05$), 表明群体间存在不同程度的分化。4个群体间遗传距离为0.05—0.15, UPGMA聚类表明, 苗尾-功果桥库区、黄登-大华桥库区和里底3个地理群体相互交叉聚类, 乌弄龙地理群体单独聚为一类。综上, 4个群体的遗传多样性处于中等水平, 遗传距离及聚类结果与试验群体地理距离基本相符, 研究结果将为光唇裂腹鱼种质资源评价与保护提供参考依据。

关键词: 光唇裂腹鱼; 简化基因组; SNP信息; 遗传多样性

中图分类号: Q145

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)01-0060-09



近些年来, 澜沧江中上游江段梯级水电站正在建设中, 有的已经建成并完成蓄水发电, 水电站的开发产生了巨大的经济效益, 也促进了当地经济的发展, 但对生态环境造成的影响也是不容忽视的, 澜沧江中上游梯级水电站的开发隔断了流域水体, 许多支流也被隔断了与澜沧江的联系, 因而破坏了河流的连续性, 造成鱼类栖息地片段化, 将对其流域内特有的土著鱼类的群体遗传多样性产生很大的影响。

简化基因组测序是通过限制性内切酶测序的基因组DNA, 获得大量遗传多态性标记序列, 充分展示该物种全基因组的测序策略, 该方法降低了基因组的复杂性、操作过程简单且成本低。同时还可以在在不依赖参考基因组的情况下获得全基因组中的遗传多态性标签, 因此被广泛应用于进化学和

基因组学^[1], 它主要是通过生物信息学来设计标记及开发程序, 收集具有特异性长度的片段并利用高通量测序方法得到大量标记序列的测序方法, 对部分基因组进行测序, 代表目标物种全基因组信息的测序方法, 目前该技术已经用于鱼类等生物间进化关系的研究, 成效显著^[2,3]。

光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatu* Tsao), 隶属于鲤形目裂腹鱼属(*Schizothorax*), 分布于澜沧江中上游, 元江上游及南盘江, 为产地常见土著鱼类^[4], 由于澜沧江梯级水电站的开发, 光唇裂腹鱼自然群体数量也逐渐减少。目前对光唇裂腹鱼的研究主要有鱼病防治、人工驯养繁殖、肉质、空壳率和耐受性等方面。但对野生光唇裂腹鱼的遗传多样性方面的研究极少, 本文主要采用简化基因组测序对光唇裂腹鱼变异位点、核苷酸多样性、等

收稿日期: 2019-11-21; 修订日期: 2020-05-14

基金项目: 农业基础性长期性科技工作国家渔业科学数据中心观测监测(ZX08S271957); 云南澜沧江鱼类增殖放流效果监测及评估项目(HY2017/S14)资助 [Supported by the Agricultural Basic Long-term Scientific and Technological Work National Fisheries Science Data Center Observation and Monitoring (ZX08S271957); Fish Proliferation and Release Effect Monitoring and Evaluation Project of Yunnan Lancang River (HY2017/S14)]

作者简介: 金方彭(1987—), 女, 硕士; 研究方向为土著鱼多样性。E-mail: 296424955@qq.com

通信作者: 李光华(1965—), 男, 副研究员; E-mail: yn11887@126.com

位基因数、观测杂合度、期望杂合度和近交系数等进行分析,以期了解澜沧江不同地理群体光唇裂腹鱼的遗传多样性,对光唇裂腹鱼种质资源方面的研究起到数据支撑作用,为今后光唇裂腹鱼进一步选育提供基础支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

此次实验材料取自澜沧江中上游苗尾-功果桥库区、黄登-大华桥库区、里底江段和乌弄龙江段4个地理群体的野生样本(表1和图1)。光唇裂腹鱼体长(20±5) cm, 体重(150±50) g, 利用液氮将尾鳍进行固定,并及时放入-85℃度冰箱保存。

1.2 DNA的提取制备

本文采用传统的苯酚-氯仿法提取基因组DNA^[5], DNA的提取质量和浓度用紫外分光光度法进行检测。将提取的基因组DNA在-20℃的冰箱中保存^[16]。

根据Sun等^[6]方法, 构建SLAF-seq文库, 本文选取锦鲤(*Cyprinus carpio*)基因组作为酶切预测的参考基因组, 其基因组大小为1.71 Gb, GC含量37.00%, (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/951/615/GCF_000951615.1_common_carp_genome/GCF_000951615.1_common_carp_genome_genomic.fna.gz), 内切酶的选择原则是避免重复序列的内切酶片段且片段必须均匀地分布在基因组中。此外, 酶切片段的数量与SLAF标签的预期数量保持一致。操作步骤如下: 在限制性片段的3'端加上poly(A), 连接一个双索引PCR扩增的特殊测序连接器。对目标片段进行纯化、混合、切割回收, Illumina HiSeq 2500用于双末端测序(PE100)。本文选用日

本晴水稻(*Oryza sativa* ssp. *japonica*)的基因组(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)作为对照组, 并将同一过程进行排序以评估建库的准确性。

1.3 数据处理

根据等位基因数量与基因序列的不同, 筛选具有多态性的SLAF标记, 以SLAF标记中序列深度最大的作为参考序列, 利用bwa将测序reads比对到参考基因组上^[7], 并使用GATK和samtools两种方法开发SNP^[8,9], 最终会得到SNP标记交集, 它便成为最终可靠的SNP标记数据集^[10,11]。然后对所获得的SNP位点进行筛选, 筛选为次要基因型频率(MAF)不小于0.05、完整度不小于0.8; 满足以上条件的SNP最终用作光唇裂腹鱼的遗传结构和群体遗传多样性分析。

使用Power-Marker V3.25软件计算观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、观测等位基因数(Observed allele number, N_o)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、期望等位基因数(Expected allele number, N_e)和多态性信息含量(Polymorphism information content); 光唇裂腹鱼的群体遗传结构利用Admixture软件^[12,13]进行分析, 个体间的亲缘关系用SPAGeDi软件^[14]进行分析, 聚类分析使用MEGA5^[15]中Neighbor-Joining算法进行。

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=n+1}^{n-1} 2P_i^2 P_j^2 \right)$$

式中, n 为某一位点上等位基因的数量, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j=i+1$ 。

$$F_{st} = \frac{F_{it} - F_{is}}{1 - F_{is}}$$

式中, F_{is} 为地方群体的平均近交系数; F_{st} 为有亲缘关系地方群体的平均近交系数; F_{it} 为整个群体的平均近交系数。

2 结果

2.1 SLAF-seq酶切及建库分析

用限制性内切酶对锦鲤进行酶切预测, 然后确定限制性内切酶组合*Rsa* I +*Hae* III对光唇裂腹鱼进行酶切, 目标片段长度为414—464 bp, 每个样本平均获得134500个SLAF标签(表2)。为保证分析质量, 采用读长为126 bp×2做数据的后续分析与评估, Control数据量为0.31 M reads。本次试验共得到240.29 M reads数据, Control数据双端率为94.32%, 酶切效率为87.19%, SLAF建库正常。Q30平均为94.96%, GC含量平均为39.80%。reads比对率均大

表1 澜沧江中上游采样点及采样时间

Tab. 1 Sampling sites and sampling time in the upper Lancang River

采样点编号 Code	群体 Population	采集时间 Time	采集地点 Site	采样数 Number
1	苗尾-功果桥	2018. 1	苗尾-功果桥库区北纬25°44'58"东经99°14'11"	9
2	黄登-大华桥	2018. 1	黄登-大华桥库区北纬26°28'56"东经99°8'31"	10
3	里底	2018. 1	里底水电站叶枝镇 北纬27°15' 25.71"东经99°5'29.08"	11
4	乌弄龙	2018. 1	巴迪乡北纬27°53'18"东经98°58'52"	29



图1 澜沧江中上游采样点

Fig. 1 Sampling points in the upper and middle reaches of Lancang River

于70%, 表明实验过程没有污染, 插入片段长度呈正态分布(图2), 建库正常。

按对照双端比对序列在基因组中的位置, 计算SLAF标签的实际读长, 绘制控制读长插入片段的长度分布图^[16]。

2.2 光唇裂腹鱼SNP标记开发

SLAF标签和SNP信息统计 本实验平均测序深度为255.2553X, 共获得474390个SLAF标签, 共得到1151083个SNP, SNP完整度: 31.54%—45.37%, 平均完整度为36.66%, SNP的杂合率: 5.55%—14.1%, 平均杂合率为9.5%(表2)。

2.3 遗传多样性分析

4个采样点的遗传多样性使用Arlequin软件进行分析, 基于过滤后的SNP(过滤掉完整度小于0.5, 第二等位基因频率小于0.05的SNP)计算各组的核酸多样性指数。序列变异位点的转换在鱼类近亲中能够更频繁的发生, 而远亲物种中更容易发生的是颠换, 同一物种不同个体之间, 转换是在嘌呤和嘌呤之间的替换, 或嘧啶和嘧啶之间的替换, 颠换是在嘌呤和嘧啶之间的替换^[17]。对4个地理群体的转换、颠换数以及替换数作显著性方差分析, 结果显示 $F(112.31) > F_{crit}(4.46)$ 且 $P(1.40E-06) < 0.01$, 转换、颠换和替换数在4个地理群体之间均呈现显著性差异: 每个地理群体的转换、颠换和替换

表2 样品SLAF标签和SNP信息统计

Tab. 2 SLAF number and SNP information statistics of sample

采样点 Site	项目样品 编号 Sample ID	对应样品所含有的 SLAF标签数 SLAF number	测序总 深度Total depth	平均测序 reads数 Average depth	检测到的 SNP总数 Total SNP	对应样品中检测 到的SNP个数 SNP num	样品中检测到的 SNP完整度 Integrity (%)	样品中SNP的 杂合率 Heter ratio (%)
苗尾-功果桥 Miaowei- Gongguo bridge	1	116471	1117720	9.5966	1151083	399748	34.73	7.15
	5	132839	2597204	19.5515	1151083	411258	35.73	6.75
	6	139084	2264998	16.2851	1151083	420474	36.53	6.61
	10	127201	1751275	13.7678	1151083	392145	34.07	6.46
	11	164776	2540565	15.4183	1151083	522297	45.37	7.26
	25	127427	1362113	10.6894	1151083	418325	36.34	5.96
	26	126747	2114541	16.6832	1151083	398024	34.58	6.53
	27	129224	2388958	18.487	1151083	396651	34.46	6.62
	28	128675	1173566	9.1204	1151083	418511	36.36	5.94
	29	115956	1339145	11.5487	1151083	378956	32.92	5.91
黄登-大华桥 Huangdeng- Dahua Bridge	34	114341	1919160	16.7845	1151083	366772	31.86	5.92
	35	123884	1172409	9.4638	1151083	411859	35.78	5.96
	36	134147	2558929	19.0756	1151083	415670	36.11	6.88
	37	136581	2474456	18.1171	1151083	411485	35.75	6.85
	38	110564	1373263	12.4205	1151083	363090	31.54	5.89
	50	112911	1195404	10.5871	1151083	369648	32.11	5.55
	56	133278	1294889	9.7157	1151083	429899	37.35	10.95
	58	146774	2339446	15.9391	1151083	434669	37.76	12.69

续表 2

采样点 Site	项目样品 编号 Sample ID	对应样品所含有的 SLAF标签数 SLAF number	测序总 深度Total depth	平均测序 reads数 Average depth	检测到的 SNP总数 Total SNP	对应样品中检测 到的SNP个数 SNP num	样品中检测到的 SNP完整度 Integrity (%)	样品中SNP的 杂合率 Heter ratio (%)
里底Lidi	59	123916	1907993	15.3975	1151083	377328	32.78	6.92
	60	145538	541967317	13.5175	1151083	450400	39.13	12.14
	100	124579	2339807	18.7817	1151083	393823	34.21	6.08
	104	140945	3100783	22	1151083	422913	36.74	7.21
	105	124798	2209816	17.7071	1151083	387489	33.66	6.58
	106	120982	1995824	16.4969	1151083	377657	32.81	6.41
	109	141191	2682743	19.0008	1151083	430034	37.36	7.02
	110	119446	1158614	9.6999	1151083	397963	34.57	5.92
	111	134081	1711624	12.7656	1151083	431886	37.52	6.18
	112	134854	2183281	16.19	1151083	418578	36.36	12.18
	113	124787	2477663	19.8551	1151083	397718	34.55	6.18
	115	122426	1943259	15.8729	1151083	377358	32.78	6.76
	116	132807	3086315	23.2391	1151083	406306	35.30	6.88
	116	132807	3086315	23.2391	1151083	406306	35.30	6.88
乌弄龙 Wunong- long	69	137334	1445898	10.5283	1151083	441725	38.37	11.18
	70	138031	1440756	10.4379	1151083	443696	38.55	11.09
	71	156330	3051013	19.5165	1151083	465867	40.47	13.78
	72	150869	3125021	20.7135	1151083	442945	38.48	14.10
	75	159369	3534395	22.1774	1151083	473637	41.15	13.98
	79	131773	1857974	14.0998	1151083	396251	34.42	12.82
	80	141166	2148195	15.2175	1151083	419416	36.44	13.37
	81	130154	1204722	9.2561	1151083	423770	36.81	10.68
	82	128952	2051787	15.9112	1151083	397773	34.56	12.06
	83	132209	1840644	13.9222	1151083	407271	35.38	12.15
	200	128229	2413331	18.8205	1151083	435803	37.86	13.36
	201	145529	2305513	15.8423	1151083	456642	39.67	13.60
	202	148363	2349966	15.8393	1151083	463468	40.26	13.01
	203	123977	1185161	9.5595	1151083	411443	35.74	10.67
	204	133471	1248873	9.3569	1151083	440787	38.29	10.69
	205	145464	2607613	17.9262	1151083	447007	38.83	12.33
	206	130042	1391660	10.7016	1151083	425261	36.94	9.79
	207	150128	2386644	15.8974	1151083	461117	40.06	12.90
	208	135345	1139567	8.4197	1151083	440176	38.24	9.92
	209	129553	1242041	9.5871	1151083	422393	36.70	10.79
	210	150272	2400700	15.9757	1151083	461351	40.08	13.10
	211	149747	2610479	17.4326	1151083	445793	38.73	13.51
	212	155129	2530954	16.3152	1151083	476799	41.42	12.75
	213	135014	1409571	10.4402	1151083	434341	37.73	11.06
	216	139699	1137315	8.1412	1151083	452062	39.27	10.77
	217	139869	2303543	16.4693	1151083	427543	37.14	12.59
	219	143780	2388391	16.6114	1151083	436276	37.90	12.69
	220	139198	2110582	15.1624	1151083	418960	36.40	12.57
	222	135490	2010339	14.8375	1151083	418904	36.39	6.62

数之间 $F(13.75) > F_{\text{crit}}(3.84)$ 且 $P(0.0012) < 0.01$ 也呈现显著性差异。苗尾-功果桥、黄登-大华桥、里底和乌弄龙4个地理群体都是转换大于颠换(表 3)。

其中, 乌弄龙地理群体的私有变异位点为5716, 远远高于其他3个地理群体, 证明在乌弄龙地理群体中存在较大变异。核苷酸多样性总价值以乌弄龙

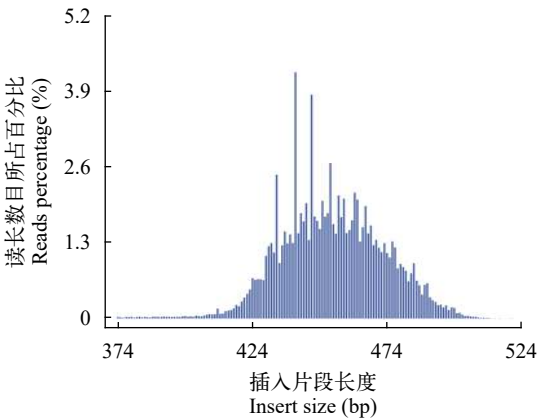


图 2 插入片段分布图

Fig. 2 Controlreads reads insertion fragment distribution diagram

表 3 核酸多样性指数

Tab. 3 Nucleic acid diversity index

核酸多样性指数	黄登- 大华桥 Huangdeng- Dahua Bridge	苗尾- 功果桥 Miaowei- Gongguo Bridge	里底 Lidi	乌弄龙 Wunong- long	平均 Mean
转换数 Number of observed transitions	19390*	30940	27327	38767	29106
颠换数 Number of observed transversions	14990*	24489	21842	24460	21445.25
替换数 Number of observed substitutions	34380*	55429	49169	55227	48551.25
每个采样点的 私有变异位点 Number of observed private sites with substitutions	8	3	4	5716	1432.75
核苷酸多样性 总价值 The total value of nucleotide diversity	10521.24	14419.46	12375.23	16590.83	13476.69

注: *表示核酸多样性指数值呈现显著性差异($\alpha=0.05$)

Note: *Indicates that the nucleic acid diversity index values show significant differences ($\alpha=0.05$)

地理群体最大, 苗尾-功果桥次之, 里底再次, 黄登-大华桥最小。

根据4个分组, 分别提每个分组的SNP, 之后过滤掉完整度小于0.5, 第二等位基因频率小于0.05的SNP; 用过滤后的SNP基于公式计算各分组的遗传多样性指数, 苗尾-功果桥、黄登-大华桥、里底和乌弄龙4个采样点的观测等位基因数均为2; 期望等位基因数、观测杂合度和期望杂合度(基因多样

性)均是乌弄龙地理群体最大(1.5029、0.3131和0.3115); 多样性指数里以底地理群体最大(0.3248), 香浓指数和多态性信息含量(PIC)均以乌弄龙地理群体最大(0.4811和0.2553), 次要基因频率以里底地理群体最大(0.2216)详见表 4。对不同地理群体的观测等位基因数、期望等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多样性指数、香浓指数、多态信息含量(PIC)做显著性分析, 结果显示 $F(55.06)>F_{crit}(3.29)$ 且 $P(2.49E-08)<0.01$, 呈显著性差异。

计算:

$$PIC = 1 - \left(\sum^n P_i^2 \right) - \left(\sum^{n-1} \sum^{n-1} 2P_i^2 P_j^2 \right)$$

2.4 群体间遗传分化分析

群体间遗传距离 根据测序结果60尾光唇裂腹鱼样本间的遗传距离介于0.05—0.15, 群体间成对 F_{st} 值(表 5)表明, 里底-乌弄龙群体的分歧最大(0.12985), 苗尾、功果桥-乌弄龙群体分歧最小(−0.01496), 平均为0.07629, 显著平均水平 $P=0.005$, 说明 F_{st} 值均达到显著性水平($P<0.05$)。

$$F_{st} = \frac{F_{it} - F_{is}}{1 - F_{is}}$$

式中, F_{is} 为地方群体的平均近交系数; F_{st} 为有亲缘

表 4 遗传多样性分析

Tab. 4 Genetic diversity analysis

多样性指标 Index	苗尾-功果桥 Miaowei- Gongguo Bridge	黄登-大华桥 Huangdeng- Dahua Bridge	里底 Lidi	乌弄龙 Wunong- long
观测等位基因数 Observed_allele_ number	2	2	2	2
期望等位基因数 Expected_allele_ number	1.4976	1.4211*	1.5028	1.5029
观测杂合度 Observed_hetero zygous_number	0.2795	0.2381*	0.3031	0.3131
期望杂合度 Expected_heteroz ygous_number	0.3041	0.2690*	0.3073	0.3115
多样性指数 Nei_diversity_ index	0.3239	0.2868*	0.3248	0.3180
香浓指数 Shnnon_Wiener_ index	0.4692	0.4269*	0.4738	0.4811
多态性信息含量 Polymorphysm_ information content (PIC)	0.2482	0.2237*	0.2508	0.2553
次要基因型频 Average_MAF	0.2192	0.1854*	0.2216	0.2202

注: *表示多样性指标呈现显著性差异

Note: *Indicates that the diversity index presents significant difference

关系地方群体的平均近交系数; F_{it} 为整个群体的平均近交系数。

表 5 光唇裂腹鱼 4 个群体间的遗传分化指数

Tab. 5 Genetic differentiation index among 4 populations of *Schizothorax lissolabiatu*s Tsao

群体	苗尾-功果桥 Miaowei- Gongguo Bridge	黄登-大华桥 Huangdeng- Dahua Bridge	里底 Lidi	乌弄龙 Wunong- long
苗尾-功果桥 Miaowei- Gongguo Bridge	0.0000			
黄登-大华桥 Huangdeng- Dahua Bridge	0.00252*	0.0000		
里底Lidi	0.13533*	0.06430*	0.00000	
乌弄龙 Wunonglong	-0.01496*	-0.00625*	0.12985*	0.0000

注:*表示经连续性Bonferroni校正后 F_{ST} 值显著性($\alpha=0.05$)

Note:* Indicates significant pairwise F_{ST} after sequential lBonferroni corrections ($\alpha=0.05$)

群体间聚类分析 由图 3 可以看出, 苗尾-功果桥、黄登-大华桥和里底 3 个地理群体的个体间相互交叉聚类, 乌弄龙地理群体的各个个体聚为一支。这表明苗尾-功果桥群体、黄登-大华桥群体和里底群体间遗传关系更接近, 乌弄龙群体与它们有相对较远的遗传距离。黄登-大华桥群体、里底群体里的个体出现少数几个和乌弄龙群体交叉聚类的情况。

群体间分子变异分析 对光唇裂腹鱼 4 个地理群体的控制区序列作分子生物学方差分析(AMOVA), 结果显示, 群体遗传分化指数 $F_{st}=0.10273$ ($P>0.01$), 群体间的变异占 10.27%, 表明遗传分化较少发生在群体间。群体内的变异占 89.73%, 表明遗传分化主要发生在每个群体内部(表 6)。

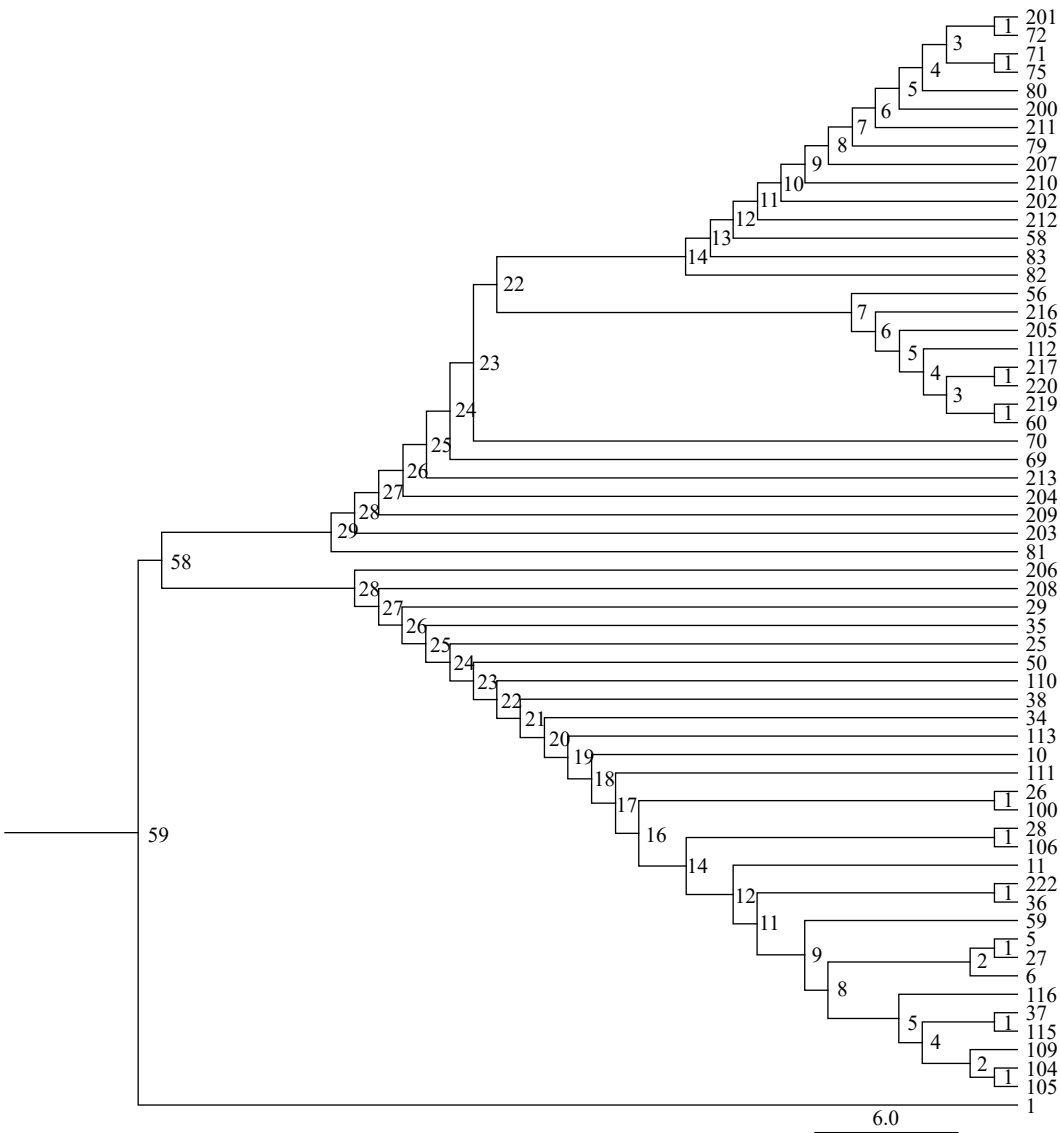


图 3 光唇裂腹鱼自然群体进化树

Fig. 3 Natural population evolution tree of *Schizothorax lissolabiatu*s Tsao

表 6 光唇裂腹鱼4个自然地理群体基于简化基因组位点的分子变异分析(AMOVE)

Tab. 6 Molecular variation analysis (AMOVE) of four natural geographic populations of *Schizothorax lissolabiatatus* Tsao based on simplified genomic loci

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和Sum of squares	变异的百分率 percentage of variation (%)	固定指数 Fixation Indices
群体间 Among population	3	59673.13	10.27	0.10273
群体内 Within population	56	205720.48	89.73	

3 讨论

3.1 变异位点分析

有研究表明, 序列变异位点的转换在鱼类的近亲中更频繁发生, 而远亲物种中更容易发生颠换, 在同一物种不同个体之间, 转换通常比颠换多, 比例为5:1, 有的甚至高达10:1^[18, 19]。本研究发现, 光唇裂腹鱼转换(T_i)与颠换(T_v)的比值大于1, 证明光唇裂腹鱼转换发生率大于颠换, mtDNA 控制区的变异更多的发生在嘌呤与嘌呤或者嘧啶与嘧啶之间, 而嘌呤与嘧啶或嘧啶与嘌呤之间的颠换则较少发生。每个采样点的私有变异位点显示, 在4个地理群体中, 群体变异位点大小依次为乌弄龙(5716)>苗尾-功果桥(8)>里底(4)>黄登-大华桥群体(3), 乌弄龙群体的变异位点远远高于其他3个地理群体, 说明乌弄龙地理群体中存在的变异大。

对光唇裂腹鱼4个地理群体的控制区序列作分子变异分析(AMOVE)表明, 群体间的变异占10.27%, 群体内的变异占89.73%, 表明遗传分化主要发生在每个群体内部, 群体间虽无显著遗传分化, 但还是一直有发生群体间的遗传分化, 与 F_{st} 分析结果相吻合。与同为裂腹鱼属的塔里木裂腹鱼(群体内变异81.01%, 群体间变异占16.68%)相比较, 群体内变异程度稍高, 群体间的变异程度没有塔里木裂腹鱼高^[25]。

3.2 遗传多样性分析

遗传多样性是物种进化潜力的重要指标。遗传多样性越高, 物种适应环境变化的能力越强, 进化潜力越大^[20, 21]。多态信息含量(PIC)主要是衡量基因位点群体多态性的重要指标, 它能够反映群体的遗传变异程度, 当多态信息含量(PIC)大于0.5时, 该位点为高度多态性位点; 当多态信息含量(PIC)小于0.25时, 该位点为低度多态性位点, 当多态信息含量(PIC)大于0.25且小于0.5时, 该位点为中度多态位点^[22-24]。本研究4个地理群体中, 除黄登-大华桥地理群体表现为低度多态性, 其余3个地理群体

均表现为中度多态性, 这些中度多态的标记为今后遗传多样性的进一步分析以及未来光唇裂腹鱼遗传连锁图谱的构建有着重要的意义。另外, 核苷酸多样性(P_i)的分析时, P_i 需要除以序列总长度才可以得到, 但是无参序列总长不好定义, 每个群的序列长度基本是一样的, 所以可以直接比较该值。

平均杂合度是群体在检测到的位点上的杂合子频率, 用于检测群体内的遗传变异, 可以度量群体的杂合程度。杂合度的高低和遗传多样性与群体对环境的适应能力呈正相关^[22], 本研究中4个地理群体的观测杂合度和期望杂合度均是乌弄龙地理群体(0.3131和0.3115)最大, 黄登-大华桥群体(0.2381和0.2690)最小。4个地理群体平均观测杂合度和期望杂合度为(0.2695和0.2892), 与同一属的短须裂腹鱼相比较(0.2007和0.3160)^[20]相比较, 杂合度较低, 遗传变异程度低, 对环境的适应能力差。

多样性指数是群落丰富度指标, 该指数越高, 群落越稳定; 香浓指数是用来反应群体的多样性的高低, 指数越大, 多样性越高^[21]。本研究光唇裂腹鱼四个地理群体的多样性指数在0.2868—0.3248, 说明4个群体多样性指数低, 群体多样性不稳定, 香浓指数在0.4269—0.4811, 与同属的短须裂腹鱼(遗传多样性指数为0.3386, 香浓指数为0.4827^[19]), 遗传多样性指数和香浓指数均较低, 说明群体多样性偏低。就群体之间看来, 乌弄龙群体的多样性最高, 可能是乌弄龙群体收人工干扰少的缘故。

3.3 遗传分化分析

根据Thorp的一系列研究, 当遗传距离大于0.05且小于0.3时为同种不同群体; 遗传距离大于0.3且小于0.9时为同属不同种; 遗传距离大于0.9为不同属^[21]。本研究中60个样本的遗传距离介于0.05—0.15, 说明研究对象为同种不同群体。根据评价标准, 当 $0 < F_{st} < 0.05$ 时, 表现为低等分化水平; 当 $0.05 < F_{st} < 0.15$ 时, 表现为中等分化水平; 当 $F_{st} > 0.15$ 时, 表现为高等分化水平^[23]。本研究中, 群体间遗传分化指数在-0.01496—0.12985, 与同属的墨脱裂腹鱼(遗传分化指数-0.014—0.771)相比较, 遗传分化指数较低^[26]。群体间分化指数均值为0.07629, 分化程度处于中等水平。除苗尾-功果桥、乌弄龙、黄登-大华桥和乌3个群体间分化处于低等水平外, 其他群体间分化都处于中等水平。

4个群体的聚类进化结果表明, 地理位置较近且想连续的苗尾-功果桥、黄登-大华桥和里底3个地理群体相互交叉聚类, 乌弄龙地理群体聚为一支, 这说明地理分布差距和遗传距离呈正相关, 随着距离的变大, 遗传距离也随之增大^[24], 由此可见, 地理

距离对光唇裂腹鱼自然群体的遗传分化程度有较大的影响, 地理位置靠近, 相互间基因交流较多, 遗传分化程度较低^[23]。此结论与群体间遗传分化程度的分析结果一致。此外, 乌弄龙群体与它们有相对较远的遗传距离, 黄登-大华桥群体和里底群体里的个体出现少数几个和乌弄龙群体交叉聚类的情况。这可能是2013年以来鱼类增殖放流活动造成的, 黄登鱼类增殖放流站2013年以来承担着大华桥、黄登、拖巴、里底及乌弄龙的人工增殖放流任务, 特别是近3年以来, 连续开展增殖放流活动, 这可能就与黄登-大华桥、里底和乌弄龙3个地理群体出现个别交叉聚类相关(表7)。就地理位置来看, 苗尾-功果桥、黄登-大华桥和里底3个点是相互连续的, 且样品采集时电站还没开始蓄水, 因此交叉聚类也符合实际情况。

表7 各采样点2014年以来增殖放流数量

Tab. 7 The number of breeding and releasing streams at different collection points from 2014 to 2018

年份 Year	苗尾-功果桥 (万尾) Miaowei- Gongguoqiao	黄登-大华桥 (万尾) Huangdeng- Dahuaqiao	里底 (万尾) Lidi	乌弄龙 (万尾) Wunong- long
2014	1	1	0	0
2015	4	3	1	2
2016	4	3	1	2
2017	4	2	1	1
2018	4	2	1	1

参考文献:

- [1] Hu Y Y, Liu L F, Ji H L, *et al.* Research progress on the reduced-representation genome sequencing technique [J]. *Journal of Jiangsu Normal University* (Natural Science Edition), 2018, **36**(4): 63-68. [胡亚亚, 刘兰服, 冀红柳, 等. 简化基因组测序技术研究进展 [J]. *江苏师范大学学报(自然科学版)*, 2018, **36**(4): 63-68.]
- [2] Duan Y Z, Wang J W, Du Z Y, *et al.* SNP Sites developed by specific length amplification fragment sequencing (SLAF-Seq) and genetic analysis in *Ammopitanthus mongolicus* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, **38**(1): 141-147. [段义忠, 王建武, 杜忠毓, 等. 基于SLAF-seq简化基因组技术的沙冬青SNP位点开发及遗传分析 [J]. *植物研究*, 2018, **38**(1): 141-147.]
- [3] Ma L N, Er R H H, Li Y K. Reduced representation sequencing in evolutionary relationship among sheep breeds based on restriction-site associated DNA [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, **49**(9): 8-12. [马丽娜, 额尔和花, 李颖康. 基于酶切的简化基因组测序在绵羊品种进化关系研究中的应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2017, **49**(9): 8-12.]
- [4] Chu X L, Chen Y R. The Fauna of Fishes from Yunnan: the First Volume [M]. Beijing: Science Press, 1989: 296-297. [褚新洛, 陈银瑞. 云南鱼类志: 上册 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 296-297.]
- [5] Xiao M S, Cui F, Kang J, *et al.* Genetic structure and variation of wild *Ophicephalus argus cantor* from Huaihe River based on MtDNA D-loop sequences [J]. *Journal of Huazhong Normal University* (Natural Science), 2009, **47**(1): 82-90. [肖明松, 崔峰, 康健, 等. 淮河乌鳢线粒体DNA控制区结构分析及遗传多样性研究 [J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2009, **47**(1): 82-90.]
- [6] Sun X, Liu D, Zhang X, *et al.* SLAF-seq: an efficient method of large-scale De novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): 58-70.
- [7] Meyer A, Lson A C. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1990(31): 359-364.
- [8] 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.
- [9] Zou J, Ma A J, Zhao Y F, *et al.* Study on the genetic structure of three cultured populations of *Takifugu obscurus* with microsatellite makers [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, **36**(2): 55-62. [邹杰, 马爱军, 赵艳飞, 等. 利用微卫星标记分析3个暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)养殖群体的遗传多样性 [J]. *渔业科学进展*, 2015, **36**(2): 55-62.]
- [10] Chen L J, Zhang S Q, Yin J, *et al.* SNP analysis of the genetic evolution of ancient *Camellia sinensis* trees from Huaxi, Guiyang [J]. *Journal of Southwest University* (Natural Science Edition), 2019, **41**(8): 33-46. [陈立杰, 张素群, 尹杰, 等. 贵阳花溪古茶树遗传进化的SNP分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, **41**(8): 33-46.]
- [11] Chen F Y, Niu H, Shi Q T, *et al.* Genome-wide association analysis on growth traits of Jiaxian red cattle [J]. *China Cattle Science*, 2018, **44**(5): 24-28. [陈付英, 牛晖, 施巧婷, 等. 郧县红牛生长发育性状全基因组关联分析 [J]. *中国牛业科学*, 2018, **44**(5): 24-28.]
- [12] Alexander D H, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals [J]. *Genome Research*, 2009, **19**(9): 1655-1664.
- [13] Price A L, Patterson N J, Plenge R M, *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies [J]. *Nature Genetics*, 2006, **38**(8): 904-909.
- [14] Hardy O J, Vekemans X, SPAGeDi. A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, **2**(4): 618-620.
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2731-2739.
- [16] Gao F Y, Si Q B T E, Zhang H, *et al.* High density genetic map of flax based on SLAF-seq technology [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2017, **39**(3): 334-341. [高风云, 斯钦巴特尔, 张辉, 等. 基于SLAF-seq技术构建亚麻高密度遗传图谱 [J]. *中国油料作物学报*, 2017, **39**(3): 334-341.]
- [17] Dong L L. The influence of SNP on transcription factor binding and gene expression [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2015: 11-30. [董立丽. SNP对于转录因子结合及基因表达的影响 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015: 11-30.]
- [18] Meyer A, Lson A C. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish [J]. *Jour-*

- nal of Molecular and Evolution*, 1990(31): 359-364.
- [19] Li G H, Jin F P, Zhou R, *et al.* Genetic diversity analysis of natural population of *Schizothorax wangchiachii* based on SNP markers [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(2): 271-276. [李光华, 金方彭, 周睿, 等. 基于SNP标记的短须裂腹鱼自然群体遗传多样性分析 [J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(2): 271-276.]
- [20] Shen S W, Tian H W, Wang D Q, *et al.* Genetic diversity of *Leptobotia rubrilabris* in the upper Yangtze River inferred from mitochondrial control region [J]. *Freshwater Fisheries*, 2017, **47**(4): 83-90. [申绍伟, 田辉伍, 汪登强, 等. 长江上游特有鱼类红唇薄鳅线粒体控制区遗传多样性研究 [J]. *淡水渔业*, 2017, **47**(4): 83-90.]
- [21] Yan C M, Du X Y, Zheng W, *et al.* Genetic diversity of four populations of *Lenok Brachymystax lenok* in mountain area of Northeast China [J]. *Fisheries Science*, 2017, **36**(6): 778-783. [闫春梅, 杜晓燕, 郑伟, 等. 中国东北部山区细鳞鱼4个群体遗传多样性分析 [J]. *水产科学*, 2017, **36**(6): 778-783.]
- [22] Su X L, Zheng G D, Jiang X Y, *et al.* Microsatellite markers analysis of two hybrids of *Megalobrama terminalis*×*Erythroculter ilishae-formis*, *Megalobrama amblycephala*×*Erythroculter ilishaeformis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(2): 264-271. [苏晓磊, 郑国栋, 蒋霞云, 等. 三角鲂×翘嘴鲌、团头鲂×翘嘴鲌两种杂交后代微卫星遗传结构分析 [J]. *水生生物学报*, 2019, **43**(2): 264-271.]
- [23] Di M Y, Zhou Z C, Li Y F, *et al.* Analysis of genetic diversity in four wild populations of jellyfish *Rhopilema esculenta* by microsatellite markers [J]. *Fisheries Science*, 2018, **37**(6): 1003-1111. [狄明玉, 周遵春, 李云峰, 等. 海蜇4个自然群体遗传多样性的微卫星标记分析 [J]. *水产科学*, 2018, **37**(6): 1003-1111.]
- [24] Di M Y. The evaluation of germplasm resources and the analysis of nutrient composition in jellyfish from different geographical population [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018: 6-30. [狄明玉. 海蜇不同地理种群种质资源评价与营养成分的差异分析 [D]. 大连: 大连工业大学, 2018: 6-30.]
- [25] Hai S. A Y L H, Guo X, *et al.* Genetic diversity and population differentiation of *Schizothorax biddulphi* based on mtDNA control region sequences [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(4): 944-954. [海萨. 艾也力汗, 郭焱, 等. 基于线粒体控制区序列的塔里木裂腹鱼遗传多样性及种群分化分析 [J]. *中国水产科学*, 2016, **23**(4): 944-954.]
- [26] Yu D, Zhang Z, Zhang J, *et al.* Genetic diversity and population demography of *Schizothorax molesworthi* from the Motuo area of lower reaches of the Yarlung Zangbo River and Lohit River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(5): 923-930. [俞丹, 张智, 张健, 等. 基于Cyt b基因的雅鲁藏布江下游墨脱江段及察隅河墨脱裂腹鱼的遗传多样性及种群历史动态分析 [J]. *水生生物学报*, 2019, **43**(5): 923-930.]

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF FOUR *SCHIZOTHORAX LISSOLABIATUS* TSAO POPULATIONS IN THE MIDDLE AND UPPER REACHES OF THE LANCANG RIVER

JIN Fang-Peng, LI Guan-Hua, LENG Yun, WU Jun-Jie, ZUO Peng-Xiang and LEI Chun-Yun

(Yunnan Academy of Fishery Sciences, Kunming 650111, China)

Abstract: Four wild *Schizothorax lissolabius* Tsao populations of 60 individuals were collected from Miaowei-Gongguoqiao Reservoir area, Huangdeng-Dahuaqiao Reservoir area, Lidi section, and Wunonglong section to analyze the genetic diversities using simplified genome sequencing. The results showed that the *Rsa* I -*Hae*III enzyme digestion efficiency was 87.19%. A total of 240.29 Mreads were obtained. Through bioinformatics analysis, 474390 SLAF tags were obtained with an average sequencing depth of 255.26X. There are 252623 polymorphic SLAF labels. A total of 1151083 SNP markers were obtained. The average SNP integrity was 36.66%, the average heterozygosity of SNP was 9.5%, the average sequencing Q30 was 94.96%, and the average GC content was 39.80%. The observed allele number in the four wild populations was 2, and the average expected allele number was 1.4211—1.5029. The average observed heterozygosity was 0.2381—0.3131 and the average expected heterozygosity was 0.2690—0.3115. The average Nei diversity index was 0.2868—0.3248 and the average Shnnon Wiener index was 0.4269—0.4811. The average MAF was 0.1854—0.2216 and the average polymorphic information content was 0.2237—0.2553. AMOVA analysis showed that the genetic variation was 89.73% within populations while it was 10.27% among populations. Genetic differentiation indexes (F_{st}) were -0.0253150—0.1299 ($P < 0.05$), indicating various degrees of differentiation among populations. The genetic distance between the four geographic groups was 0.05—0.15. UPGMA clustering showed that Miaowei-Gongguoqiao Reservoir, Huangdeng-Dahuaqiao Reservoir and Lidi populations were clustered into one glade due to relatively close genetic distances, while Wunonglong population was separated into another class. To sum up, the genetic diversity of the four groups was at the medium level. The genetic distance and clustering results were consistent with the geographical distance of the test population. These results can provide a reference for molecular genetic breeding and germplasm protection of *Schizothorax lissolabius* Tsao.

Key words: *Schizothorax lissolabius* Tsao; Simplified genomes; SNP information; Genetic diversity