

文章编号: 1000-0615(2004)03-0241-04

## 微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析

梁利群<sup>1</sup>, 常玉梅<sup>1,2</sup>, 董崇智<sup>1</sup>, 孙效文<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 农业部北方鱼类基因工程育种实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;  
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**从网上查询获得鳞微卫星标记 30 对, 并对乌苏里江哲罗鱼的基因组进行遗传多样性分析, 结果筛选出 10 对具多态性的微卫星标记。并用其中 6 对微卫星引物对 17 尾乌苏里江哲罗鱼进行基因组 DNA 扫描检测。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测微卫星标记的 PCR 扩增产物, 并对扩增结果进行了统计分析, 计算了 6 个基因座的等位基因频率、杂合度等。结果表明, 乌苏里江哲罗鱼等位基因频率为 0.0455~0.7857, 多态信息含量(PIC)为 0.2801~0.6351, 杂合度(H)为 0.3368~0.6563。统计结果初步表明乌苏里江哲罗鱼的遗传多样性程度处于中等偏下水平。同时, 结合资源量下降的事实, 建议在保护遗传多样性的前提下对其采取人工繁殖和放流的方法增加其种群数量。

**关键词:** 哲罗鱼; 微卫星标记; 遗传多样性; 乌苏里江  
**中图分类号:** Q346.5; S931.1 **文献标识码:** A

## Genetic analysis for *Hucho taimen* in Wusuli River with microsatellites

LIANG Li-qun<sup>1</sup>, CHANG Yu-mei<sup>1,2</sup>, DONG Chong-zhi<sup>1</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Bioengineering Breeding of Northern Fish, Ministry of Agriculture, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China;  
2. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** *Hucho taimen*, a kind of cold water fish, is mainly distributed in Huma branch of Heilongjiang River, upper reaches of Wusuli River and Hanasi Lake of Xingjiang Uighur Autonomous Region. In recent years, the number of its population extremely decreased due to environmental deterioration, intense capture and so on. In a word, this treasure species has been considered as one of the endangered species in China. So, it is very urgent for researchers to protect this fish with effective methods as soon as possible. However, the first thing should be done is to learn about genetic diversity of its natural population, then, to take some valuable measures to restore its population. Now, molecular markers are very useful tools in estimation of germplasm resources, variety identification and preparation of genetic linkage map. 30 microsatellites derived from *Oncorhynchus mykiss* were obtained from nucleotide web sites and designed primers (Primer 3.0) by their flanking sequences, then applied to analyze the genetic diversity for *Hucho taimen* in Wusuli River by using PCR method. As a result, 10 microsatellite markers were amplified polymorphisms for genomic DNA of *Hucho taimen*, and of which 6 markers were assessed

收稿日期: 2003-02-21

资助项目: 国家公益性项目

作者简介: 梁利群(1963-), 女, 黑龙江人, 副研究员, 研究方向为鱼类基因工程育种。E-mail: llq1019@163.com

genetic diversity for 17 individuals. The PCR products were electrophoresed by 2% agarose gel, and the data like allelic frequencies and heterozygosities were calculated and analyzed by statistic method. As a consequence, the data showed that allelic frequency ranges from 0.0455 to 0.7857, PIC value (polymorphism information content) from 0.2801 to 0.6351, and heterozygosity from 0.3368 to 0.6563. All of these indices indicated that genetic diversity of *Hucho taimen* was not inspiring at present. Therefore, considering the reduction of its populations, this research aimed at attracting much attention to protecting its genetic diversity. According to the findings, it is suggested to enlarge its population naturally through artificially reproduced exiling. Meanwhile, make sure the size of effective breeding population more than 200 individuals, in order to avoid the occurrence of genetic "bottle neck".

**Key words:** *Hucho taimen*; microsatellites marker; genetic diversity; Wusuli River

哲罗鱼 (*Hucho taimen* Pallas) 属高寒地区特产冷水性鱼类, 目前主要分布于黑龙江呼玛河、乌苏里江上游及新疆哈纳斯湖。生长速度快, 属凶猛肉食性鱼类, 有明显的季节洄游习性。近年来由于江河污染、捕捞强度过大, 导致哲罗鱼的种群数量较上世纪 50 年代有明显下降趋势, 种群数量处于濒危状态<sup>[1-3]</sup>。因此, 充分了解乌苏里江哲罗鱼的种群结构、遗传多样性现状、栖息环境状况等, 对今后进行保护性开发具有重要意义。在真核生物的基因组中广泛分布着许多简单重复的 DNA 片段, 一般每个重复单位仅有 1~4 个碱基, 重复数为 10~20 次左右被称之为微卫星标记, 也称简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSLP)。微卫星 DNA 多态性 (SSLP) 的产生主要源于不同的重复数, 这种标记具有种属保守性、共显性遗传和多态性程度高等遗传特点。目前这一标记已广泛应用于遗传连锁图谱的制备、基因定位、品种鉴定等方面<sup>[4-6]</sup>, 但应用 SSLP 标记技术分析乌苏里江哲罗鱼的种内遗传多样性尚未见报道。

本研究应用鳟的 SSLP 标记分析了乌苏里江虎头江段哲罗鱼基因组 DNA 样品, 计算了微卫星基因座的等位基因频率、多态信息含量 (PIC) 及基因杂合度, 评估了它的遗传多样性程度, 初步探讨了对其进行遗传多样性保护的必要性。

## 1 材料和方法

### 1.1 鱼类鳍条样品的采集

2001 年 10 月 20-30 日, 在乌苏里江上游虎头江段的三层刺网渔获物中剪取 17 尾乌苏里江哲罗鱼鳍条, 放入无水乙醇中固定保存。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

将保存在无水乙醇中的鳍条样品在纯水中反复清洗 3 次, 在室温凉干使乙醇完全挥发, 加入 10

倍于鳍条样品重量的 DNA 提取裂解液 (10mmol·L<sup>-1</sup> EDTA pH 8.0; 200μg·mL<sup>-1</sup> Proteinac K; 0.5% Sarcosyl), 50℃ 消化 12h, 用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 3 次, 无水乙醇沉淀, 真空干燥后溶解于 1/10 TE 中 (10mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH8.0, 1mmol·L<sup>-1</sup> EDTA pH 8.0), 4℃ 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

SSLP 引物设计 网上查询 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query)) 有关鳟微卫星的研究结果, 利用美国白头医学研究所的 PRIMER 3 程序, 根据虹鳟的微卫星序列在重复序列的上、下游设计 PCR 引物, 上海生工生物工程公司合成 5 OD 的鳟 SSLP 引物。本实验从 30 对引物中筛选出 10 对有稳定扩增产物的引物对样品进行 PCR 扩增分析, 其序列情况见表 1。

PCR 反应体系 反应总体积为 25μL, 其中模板 DNA 1.5μL (10ng), 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.3), 50mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 15mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 明胶, 0.1% Tween-100, dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 2 mmol·L<sup>-1</sup>, 引物为 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, Taq 酶为 1.5U。

PCR 反应程序 93℃ 3min; 92℃ 30s, 55~60℃ 30s, 72℃ 30s, 38 个循环; 72℃ 5min。在 PERKING Gene Amp PCR System 9700 型 PCR 仪上进行反应。

### 1.4 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5μg·mL<sup>-1</sup> EB) 和缓冲液为 0.5×TBE 中电泳, 以 5V·cm<sup>-1</sup> 电压下电泳 2~3h, 用 GDS8000 凝胶成像仪 (UVP 公司) 进行分析鉴定。并用 1Gelworks 软件包 (3.0 版本) 对每个扩增带 DNA 的分子量进行估算, 弱带 Peaks Intensity 不小于 48 (DNA 含量介于 10~20ng 之间)。

## 1.5 统计指标

按下列公式计算微卫星基因座的等位基因频率( $F$ )、多态信息含量( $PIC$ )和基因杂合度( $H$ )。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n F_i^2$$

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

其中  $n$  为该位点的等位基因数;  $F_i$ 、 $F_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因在群体中的频率,  $j = i + 1$ 。

表 1 SSLP 引物序列和重复序列

Tab.1 Sequence of SSLP primers and motifs

引物 primer	序列 sequence	重复序列 motifs
AF346680	cc agt gcta ccga cactg aa g ctg tcttg ga gag act gg	(tc) <sub>12</sub>
AF346694	ca gcc taatg gg agt tctgt cc ctccct gfga cttcaa	(taga) <sub>18</sub>
AF346679	ct cccca gag atca gaca gg cc tcaaca tgg gta aata gta	(ga) <sub>21</sub>
AF346676	tg ccc ceatg agta aacat a tct ctctctt cctctctc ca	(ga) <sub>15</sub>
AF346673	ctt ctgg g gaca gat gg aaa ca ga gaac agc ag gag tcca	(ca) <sub>14</sub>
AF346686	tc gg actg gctt gttg tattc agcc accat ctccalc cta	(tata) <sub>18</sub>
G73807	at gg ctcca ctttga ggatg tca cag ctac cag gata cg	(ac) <sub>49</sub>
AF346695	g ctg acaa cacag aca caga ca tta ctgca tgc ccaca catt	(gala) <sub>15</sub>
AF346693	g gc acaa gttg caaa gatg a ttaa cg ccaag g gatttc tg	(teta) <sub>11</sub>
AF346691	g tg gg ttgt cat gttg ga cc caaa cccataa ccaaa cc	(tg) <sub>12</sub>

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 扩增结果

选用 30 对鱧的 SSLP 引物对 17 尾乌苏里江哲罗鱼 DNA 样品进行 PCR 扩增, 有 10 对 SSLP 引物扩增出清晰的条带, 共产生 125 个扩增片段(图 1), 平均每对引物扩增出 12.5 条。这一结果证明鱧的 SSLP 标记可用于乌苏里江哲罗鱼基因组 DNA 遗传多样性分析。也说明借用同属、同科鱼的 SSLP 标记开展基因组遗传多样性检测分析可行。

### 2.2 遗传多样性分析

根据微卫星引物的扩增结果, 选其中 6 对引物的扩增数据进行等位基因频率和多态信息含量等统计分析(表 2)。在乌苏里江哲罗鱼中检测到 AF346680 有 3 个复等位基因, 等位基因频率最高为 0.5455。AF375053 有 3 个复等位基因, 等位基因频率最高为 0.6364。AF346686 有 2 个复等位基因, 等位基因频率最高的为 0.7857。AF346694 有 2

个复等位基因, 等位基因频率最高为 0.6250。AF346673 有 3 个复等位基因, 等位基因频率最高为 0.4000。AF346676 有 2 个复等位基因, 等位基因频率最高为 0.6000。微卫星的多态性能够反应物种的进化史, 群体中等位基因频率最高的是该物种中最原始、最保守的。其它的等位基因是进化过程中等位基因突变形成的。我们推测 AF346680 基因座的 120bp 等位基因、AF346676 基因座的 139bp 等位基因、AF346694 基因座的 137bp 等位基因、AF346686 基因座的 163bp 等位基因、AF346673 基因座的 368bp 等位基因、AF375053 基因座的 112bp 等位基因可能是乌苏里江哲罗鱼最原始的等位基因。



图 1 微卫星引物 AF346680 对乌苏里江哲罗鱼基因组 DNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 PCR result of genomic DNA of *H. taimen* obtained by primer AF346680  
M 为分子量标准 M: molecular marker

多态信息含量反映了基因座位在群体中的多样性情况( $PIC > 0.5$  说明基因座为高度多态基因座,  $0.2 < PIC < 0.5$  为中度多态基因座)<sup>[7]</sup>。经过推算乌苏里江哲罗鱼的  $PIC$  值的范围在 0.2801~0.6351 之间, AF346673 引物为高度多态基因座, 其它为中度多态基因座。

杂合度又称基因多样性, 反应群体在多个基因座上的遗传变异。普遍认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数。本研究计算了乌苏里江哲罗鱼的基因杂合度, 其范围在 0.3368~0.6563 之间, 群体平均杂合度为 0.4980。AF346673 基因座的遗传变异最大(0.6563), AF346686 最小(0.3368)。说明乌苏里江哲罗鱼群体的遗传多样性程度处于中等偏下水平, 故应加强对其遗传多样性进行保护。

分子遗传多样性是指种内个体间表现在分子水平的遗传变异度和遗传多态性程度, 而物种的遗传多样性是生命进化和适应的基础, 因此, 保护物种特别是濒危物种的遗传多样性非常必要<sup>[8,9]</sup>。

表 2 乌苏里江哲罗鱼 6 个微卫星基因座统计学指标  
Tab. 2 Statistic indicies of 6 microsatellite loci for *H. taimen*

基因座 locus	等位基因 allele	基因频率 gene frequency	基因纯合度 gene homogeneity	杂合度 heterozygosity	多态信息含量 polymorphism information content
AF346680	120	0.4091	0.4671	0.5329	0.4333
	190	0.5454			
	253	0.0455			
AF375053	112	0.6364	0.4871	0.5129	0.4526
	168	0.2727			
	341	0.0909			
AF346686	156	0.2143	0.6632	0.3368	0.2801
	163	0.7857			
AF346673	201	0.2571	0.3437	0.6563	0.6351
	368	0.4000			
	587	0.3429			
AF346694	137	0.6250	0.5312	0.4688	0.3590
	155	0.3750			
AF346676	139	0.6000	0.5200	0.4800	0.3468
	157	0.4000			

目前哲罗鱼已被列入濒危物种(鱼类)。结合群体数量日趋减少的现状,采取人为的方法对其进行人工繁殖,定期向江河、溪流中投放鱼种对扩大其种群数量,避免种群遗传多样性减少,减缓其灭绝速度是非常有意义的。但进行人工繁殖和放流切繁殖群体的数量要保持在 200~ 500 尾以上,这样可避免遗传“瓶颈”现象的出现。

种内的遗传多样性是一个物种对人为干扰进行成功反应的决定因素,经过漫长的进化历程野生鱼类对环境的适应能力及所具有的遗传多样性对人类具有不可替代的潜在价值。因此保护野生鱼类的遗传多样性,将为人类提供广泛的选择余地,以应付未来环境的变化。鱼类品种很少是永远不变的,利用野生鱼类资源的遗传特性,并对其加以保护改良,对支持和改进渔业生产,保障渔业可持续发展是非常必要的。

#### 参考文献:

- [1] Dong C Z, Cao D C. Investigation on endangered Wusuli River *Hucho Taimen*[A]. Resources investigation reports on the river and lake borders of Heilongjiang River[C]. 2002, 180- 182. [董崇智,曹顶臣. 乌苏里江哲罗鱼濒危状况调查[A]. 黑龙江水系河界江界湖渔业资源调查报告汇编[C]. 2002, 180- 182.]
- [2] Ren M L. Fishes of Heilongjiang River[M]. Harbin: Heilongjiang People's Press, 1981. 17- 19. [任慕莲. 黑龙江鱼类[M]. 哈尔

滨: 黑龙江人民出版社, 1981. 17- 19.]

- [3] Zhang J M. Fishes of Heilongjiang Province[M]. Harbin: Heilongjiang Sci Tech Press, 1995. 34- 36. [张觉民. 黑龙江鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995. 34- 36.]
- [4] Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genom-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Theor Appl Genet, 1997, 5: 557- 567.
- [5] Fan Y Y, Zhuang J Y, Wu J L, et al. SSLP-based identification of subspecies in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Hereditas (Beijing), 2000, 22(6): 392- 394. [樊叶杨, 庄杰云, 吴建利, 等. 应用微卫星标记鉴别水稻灿粳亚种[J]. 遗传, 2000, 22(6): 392- 394.]
- [6] Li Y H, Xiao H, Zhang Q C, et al. Genetic variation of main parents of hybrid rice in China was revealed with simple sequence repeat markers[J]. Acta Botan Sin, 1999, 41(10): 1061- 1066. [李云海, 肖 晗, 张庆春, 等. 利用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1061- 1066.]
- [7] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Gene 1980, 32: 314- 331.
- [8] Ji W Z, Xu B. Principles and methodologies of genetic diversity studies[M]. Hangzhou: Zhengjiang Technology Press, 1999. [季维智, 宿 兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.]
- [9] Jiang Z G, Ma K P, Han X G. Conservation biology [M]. Hangzhou: Zhengjiang Technology Press, 1999. [蒋志刚, 马克平, 韩兴国. 保护生物学[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.]