

文章编号: 1000-0615(2005)05-0612-07

## 黄鳝微卫星引物筛选及其在保护遗传学上的应用

鲁双庆<sup>1</sup>, 刘少军<sup>2</sup>, 刘红玉<sup>3</sup>, 刘臻<sup>1</sup>, 刘筠<sup>2</sup>(1. 长沙大学生物工程与环境科学系, 湖南长沙 410003; 2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081;  
3. 湖南大学环境科学与工程系, 湖南长沙 410082)

**摘要:** 研究了远缘种鲤的微卫星引物对黄鳝的适用性。结果显示, 31 对鲤微卫星引物中有 11 对引物能对黄鳝 DNA 模板扩增出特异性带谱。每对引物扩增的等位基因数在 3~13 个, 平均每个位点有 5.6 个等位基因, 显示了较高的多态性。其中引物 P1 最理想, 其 PCR 扩增产物能区分来自湖南、广东和孟加拉 3 个不同地域的黄鳝种群。应用微卫星技术对 3 个不同地域的黄鳝基因组 DNA 多态性分析结果显示, 湖南、广东和孟加拉黄鳝群体内平均相似率依次为 95.5%, 95.8% 和 93.5%, 平均变异度依次为 0.045, 0.042, 0.063。群体间的相似率及变异度分析显示: 湖南黄鳝和广东黄鳝群体间平均相似率为 91.0%, 变异度为 0.045; 湖南黄鳝和孟加拉黄鳝群体间平均相似率和变异度分别为 55.7% 和 0.443; 广东黄鳝和孟加拉黄鳝群体间平均相似率和变异度分别为 58.6% 和 0.414。综合微卫星分析结果、黄鳝的外形特征及地理位置, 可以推测, 广东黄鳝与湖南黄鳝为同一个生物种的不同地理种群, 而孟加拉黄鳝为同属中另一个种。

**关键词:** 黄鳝; 微卫星; 引物; 遗传多样性**中图分类号:** S917 **文献标识码:** AScreening of microsatellite primer and its application  
to conservation genetics of *Monopterus albus*LU Shuang-qing<sup>1</sup>, LIU Shao-jun<sup>2</sup>, LIU Hong-yu<sup>3</sup>, LIU Zhen<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>2</sup>

(1. Department of Biotechnology &amp; Environment Science, Changsha University, Changsha 410003, China;

2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

3. Department of Environmental Science &amp; Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** The applicability of microsatellite primers from *Cyprinus carpio* to *Monopterus albus* population was studied in the present paper. The results showed that 11 of the 31 pairs of microsatellite primers from *Cyprinus carpio* could amplify *Monopterus albus* DNA and produce special allele patterns. The allele numbers for each primer ranged 3 to 13, and a mean of 5.6 alleles were found for each locus, which indicated a higher polymorphism. P1 was the most perfect primer among all these 11 pairs, which could distinguish the 3 *Monopterus albus* populations collected from Hunan, Guangdong (China) and Bengal. The results of the polymorphisms of genetic DNA of *Monopterus albus* populations from the 3 different locations showed that the average similarity of the 3 *Monopterus albus* populations from Hunan, Guangdong and Bengal was 95.5%, 95.8% and 93.5%, respectively, and the average variability was 0.045, 0.042 and 0.063, respectively. The average similarity and variability between every two of the three populations were: 91.0% and 0.045 between Hunan and Guangdong populations, respectively, 55.7% and 0.443 between Hunan and Bengal populations, respectively, and 58.6% and 0.414 between Guangdong and Bengal populations, respectively. By summarizing all the data from microsatellite analysis, morphological characteristics and geographic distribution, the authors could deduce that the *Monopterus albus* populations from Hunan and from Guangdong were the same species, and the population from Bengal belongs to another species.

**Key words:** *Monopterus albus*; microsatellite; primer; genetic polymorphism

收稿日期: 2004-10-11

资助项目: 湖南省自然科学基金(03JJY4010); 湖南省教育厅青年科研项目(03B001)

作者简介: 鲁双庆(1963-), 男, 湖南岳阳人, 教授, 博士。主要从事鱼类遗传育种与生物技术研究。Tel: 0731-4261463, E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn

黄鲮属硬骨鱼类合鳃目合鳃科,在我国仅有1种,且属定居性种类,近亲繁殖严重<sup>[1]</sup>,对环境的抵抗力相对较弱,种质资源较贫乏,再加上过度捕捉,农业化学物质(各种杀虫剂、除草剂等)的大量使用、工业污染物的排放,使水环境质量日趋恶化,导致黄鲮的种质资源进一步减少。因此,进行黄鲮种质资源调查,及时采取有效措施,保护黄鲮资源,具有重要意义。

微卫星标记(microsatellite marker)是20世纪80年代以来研究动植物种质资源、亲缘关系和遗传多样性非常重要的分子生物学工具。但是迄今为止,在黄鲮基因组DNA多态性研究、黄鲮种质资源调查方面,国内外尚未见报道。由于微卫星DNA所在区域的核苷酸序列比较保守,因此某一物种的微卫星引物可在相近物种中使用<sup>2</sup>。周莉等<sup>3</sup>已成功地采用Crooijmans等<sup>[4]</sup>从鲤分离的微卫星DNA标记进行了银鲫不同雌核发育系的比较研究。

本文研究了鲤微卫星引物对黄鲮微卫星DNA扩增的适用性,并采用筛选的适宜引物对从湖南、广东和孟加拉3个不同地域收集的黄鲮基因组DNA的多态性进行了比较研究,为调查黄鲮种质资源状况,采取有效保护措施提供有力的分子生物学依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

实验所用的黄鲮(*Monopterus albus*)为来自湖南、广东和孟加拉3个不同地域,各20尾(雌雄各一半)。其中湖南黄鲮(代号:h)采集于益阳黄鲮养殖场,广东黄鲮(代号:g)采集于顺德市三洲养殖场,孟加拉黄鲮(代号:m)购自广州市黄沙水产市场。

### 1.2 基因组DNA制备

取黄鲮血液100  $\mu\text{L}$ ,加DNA抽提液500  $\mu\text{L}$ (DNA抽提液的配制为10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA pH 8.0, 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl),加入10% SDS, RNA酶、蛋白酶K,至终浓度分别为:0.5% SDS, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  RNA酶、200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白酶K。混匀后,55  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化过夜(8~12 h),期间转动离心管混匀数次。消化完毕后,按常规酚抽提法去除蛋白质,用琼脂糖凝胶电泳法分析样品中DNA的纯度。得到的

DNA溶液经乙醇沉淀后进一步纯化,-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用(饱和酚、RNA酶、蛋白酶K均购自华美生物工程公司)。模板DNA的纯度和浓度用琼脂糖凝胶电泳,结合GDS3000PC凝胶成像分析仪检测。

### 1.3 样品DNA浓度测定

以 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 酶切片段为标准,用0.8%琼脂糖凝胶(含0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的EB)、电压为90 V的条件下电泳。用GDS3000PC凝胶成像分析系统对凝胶进行扫描,可分别得到凝胶中Marker和样品中DNA的相对含量(图1)。通过换算,可得出样品DNA浓度。换算公式为:

$$\text{样品DNA浓度} = \frac{\text{DNA marker浓度} \times \text{加样量}}{\text{DNA marker相对量}} \times \text{样品DNA相对含量} \div \text{样品加样量}$$



图1 部分黄鲮样品的DNA模板电泳图谱  
Fig.1 Electrophoresis pattern of DNA model chain of some *Monopterus albus* samples

### 1.4 微卫星PCR引物

参考Crooijmans等<sup>[4]</sup>筛选的鲤微卫星引物序列设计了31对微卫星引物,由上海生物工程公司合成。

### 1.5 PCR扩增及电泳检测

PCR反应总体积为25  $\mu\text{L}$ ,内含模板DNA 45 ng,引物0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTPs 1.0 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ , 10 $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA聚合酶1.5 U, 25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub> 2.5  $\mu\text{L}$ (*Taq* DNA聚合酶、dNTPs均购自北京华美生物工程公司)。PCR扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ 复性45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s, 经35次循环后, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。扩增产物通过8%聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离。在1 $\times$ TBE电泳缓冲液, 280 V恒压下电泳2.5 h, 电泳完毕后,凝胶板经Sanguinetti银染方法染色<sup>[5]</sup>,用GDS 3000 PC凝胶成像分析系统对凝胶中PCR扩增产物进行扫描分析。

## 1.6 数据统计方法

根据聚丙烯酰胺凝胶上 DNA 条带的迁移距离,参照 Marker 的分子量标记,统计 3 个黄鳢品系表现出的多态性带的数目及碱基对数。根据 Lynch 法计算相似率<sup>[6]</sup>。

群体内(间)相似率( $M$ )(%) =  $(2 \times Nab) / (Na + Nb) \times 100$

其中, $Nab$  为个体  $a$  和个体  $b$  之间共有的 DNA 扩增片段数目, $Na$  为个体  $a$  具有的 DNA 扩增片段总数, $Nb$  为个体  $b$  具有的 DNA 扩增片段总数。

群体内(间)变异度(即遗传距离  $D$ )按公式  $D = 1 - M$  计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星引物初筛

实验参考 Crooijmans 等<sup>[4]</sup>筛选的 31 对长度为 18 ~ 24 bp 的鲤微卫星引物对黄鳢的基因组 DNA 模板进行 PCR 扩增,经电泳检测,初步选定其中有较明显扩增产物的 14 对微卫星引物(其碱基序列见表 1),并对黄鳢 DNA 进行系统研究。

表 1 14 对微卫星引物碱基序列

Tab.1 Sequences of the 14 pairs of microsatellite primers

引物编号 primer number	原编号 original number	基因位点 locus	序 列 sequence
P1	MFW1	Malb1	GTCCAGACTGTCATCAGGAGGAGGTGTACACTGAGTCAACGC
P2	MFW2	Malb2	CACACCGGGCTACTGCAGAGGTGCAGTGCAGGCAGTTTGC
P3	MFW3	Malb3	GATCAGAAGGTACAGAGAAGCCTTACAGAAAACCTGTTTGC
P4	MFW4	Malb4	TCCAAGTCAGTTTAAATCACCGGGGAAGCGTTGACAACAAGC
P6	MFW8	Malb6	CACCTTAGCATGGCAAATTTTCCCTATAACTCCTGAAGGCAGAC
P7	MFW9	Malb7	GATCTGCAAGCATATCTGTCGATCTGAACCTGCAGCTCCTC
P8	MFW15	Malb8	CTCCTGTTTTGTTTTTGAAAGTTCACAAGGTCATTTCCAGC
P11	MFW6	Malb11	ACCTGATCAATCCCTGGCTCTGGGACTTTTAAATCACGTTG
P12	MFW7	Malb12	TACTTTGCTCAGGACGGATGCATCACCTGCACATGGCCACTC
P14	MFW11	Malb14	GCATTTGCCTTGATGGTTGTGTCGTCTGGTTTAGAGTGTCTGC
P17	MFW16	Malb17	GTCCATTGTGTCAAGATAGAGTCTTCATTTTCAGGCTGCAAAAG
P18	MFW17	Malb18	CTCAACTACAGAGAAATTTTCATCGAAATGGTACATGACCTCAAG
P19	MFW18	Malb19	GTCCCTGGTAGTGAGTGAGTGCCTTACTGTTTATACTAG
P21	MFW20	Malb21	CAGTGAGACGATTACCTTGGGTGAGCAGCCACATTGAAC

### 2.2 14 对引物对黄鳢不同群体 DNA 中微卫星产物扩增

将初筛得到的 14 对微卫星引物对 3 个不同地域黄鳢 DNA 模板进行 PCR 扩增。经检测,引物 P4、P17、P18 扩增带非常弱难分辨,引物 P3、P11、P19 扩增的带谱中 DNA 多态性较弱(只 3 条带),其余 8 对引物都能对黄鳢 DNA 模板产生各自特有的、清晰的微卫星带谱,电泳图谱的条带多,能较灵敏地反映黄鳢 DNA 的多态性,如图 2、3 所示的引物 P1、P6 对 3 个不同地域的部分黄鳢 DNA 模板的扩增产物,充分显示了黄鳢微卫星 DNA 丰富的多态性。

### 2.3 区分 3 个地域黄鳢种群的 DNA 分子标记

筛选的 11 对引物对 3 个地域黄鳢种群进行 PCR 扩增,产生的等位基因谱系差异显著。表 2

列出了能区分 3 个不同地域黄鳢种群的等位基因谱。引物 P1 的扩增产物中,有能区分 h、g 和 m 的特征性 DNA 带:P1-364, P1-325, P1-217, P1-137, P1-129 为孟加拉黄鳢所特有;P1-112 和 P1-391 分别为湖南黄鳢和广东黄鳢所特有;引物 P2、P3、P6、P7、P14、P21 的 PCR 扩增产物中有区分孟加拉黄鳢种群的特征性带;引物 P2 的扩增产物中有分辨广东黄鳢的特征性带;引物 P6、P12 和 P14 的 PCR 扩增产物谱系中有区分湖南黄鳢的特征性带;引物 P3、P8、P11 和 P19 的扩增产物谱分辨率相对较低,条带较少,只能区分孟加拉黄鳢和湖南、广东黄鳢,而湖南黄鳢和广东黄鳢之间的差异没有显示。因此,P1 是最理想的引物,其 PCR 扩增产物能区分来自湖南、广东和孟加拉 3 个不同地域的黄鳢种群。

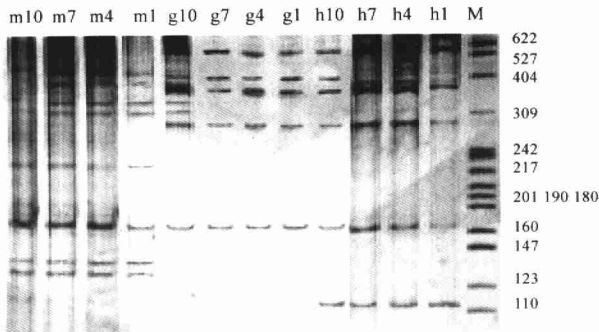


图2 引物 P1 扩增的黄鳍部分样品的微卫星 DNA 带谱

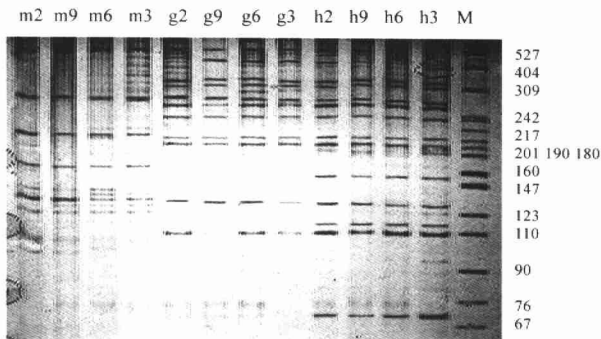
Fig.2 Pattern of microsatellite band amplified by primer P1 from some samples of *Monopterus albus*

图3 引物 P6 扩增的黄鳍部分样品 DNA 微卫星带谱

Fig.3 Pattern of microsatellite band amplified by primer P6 from some samples of *Monopterus albus*

## 2.4 三个种群群体内和群体间的遗传相似率和变异度分析

采用 11 对引物对来自湖南、广东和孟加拉 3 个不同地域的 60 尾黄鳍个体的 DNA 进行 PCR 扩增, 总共获得 2435 条带, 总位点数为 90 个, 每对引物扩增的带数在 3 ~ 13 条之间, 平均每个位点有 5.6 个等位基因。等位基因的大小变化区间较大, 为 60 ~ 520 bp (图 2、图 3 和表 2、表 3)。一般地, DNA 分子的碱基对在 90 ~ 300 bp 之间时, 在电泳图谱上的分辨率较高, 分子量太大时, DNA 分子的泳动速度慢, 迁移距离短, 容易出现误判。

**群体内相似率及变异度分析** 比较 3 个种群群体内的任意 2 个个体的微卫星电泳带谱, 统计出 2 个个体 ( $a$  和  $b$ ) 各自拥有的微卫星带总数 ( $N_a + N_b$ ) 以及它们共同拥有的微卫星带数 ( $N_{ab}$ ), 计算出 3 个群体内个体间的遗传相似率及变异度见表 4。群体内平均遗传相似率以大小次序为广东黄鳍 (95.8%) > 湖南黄鳍 (95.5%) > 孟加拉黄鳍 (93.5%), 变异度次序则相反。

**群体间相似率及变异度分析** 表 5 显示了来自湖南、广东和孟加拉 3 个不同地域的黄鳍种群间的相似率及变异度。3 个种群中, 湖南黄鳍与

广东黄鳝种群之间的相似率最高,平均相似率为91%。其变异度相应地最小,为0.09。孟加拉黄鳝与湖南、广东黄鳝种群间的相似率小,分别为55.7%和58.6%。其变异度也就相对较大,分别为0.443和0.414。可以推测,黄鳝种群间遗传相似率与种群地理区域有关联。

表2 不同地域黄鳝种群的微卫星分子标记

Tab.2 Molecular markers reproduced by PCR from microsatellite primers

位点 locus	区分不同品系的等位基因 alleles for distinguishing different strains	含有该标记的品系 strains including the marker
Malb1	M1-364, M1-325, M1-217, M1-137, M1-129	m
	M1-112	h
	M1-391	g
	M1-570, M1-364, M1-259	h, g
Malb2	M2-201, M2-170	m
	M2-90	g
	M2-280, M2-110	g, h
Malb3	M3-203	m
	M6-160, M6-127, M6-123	m
Malb6	M6-180, M6-154, M6-115, M6-72	h
	M6-268, M6-242, M6-190, M6-110	h, g
	M7-217, 9-M7-67	m
Malb7	M7-242, M7-60	h, g
	M8-70	h, g
Malb8	M8-70	h, g
Malb11	M11-341	h, g
Malb12	M12-127	h
	M12-333, M12-215, M12-157, M12-141	h, g
	M14-166, M14-345	h, g
Malb14	M14-137	m
	M14-340, M14-236, M14-203, M14-178,	h
	M14-147, M14-123	h, g
	M19-88	h, g
Malb21	M21-280, M21-110	m
	M21-350, M21-82, M21-64	h, g

注: Mx-y 表示引物 x 扩增的黄鳝含 y 对碱基的等位基因

Notes: Mx-y indicates the allele which has y pairs of base amplified by primer x

### 3 讨论

#### 3.1 远缘物种间微卫星引物的适用性

由于微卫星核苷酸序列的保守性,使一物种的微卫星引物可能适用于相邻物种。以往的研究多集中于微卫星引物在相邻种及亚种间采用。本实验材料鲤和黄鳝分属于鲤形目和合鳃目,在鱼类中它们的亲缘关系较远。但实验结果显示,部分鲤微卫星 DNA 引物适用于黄鳝。31 对鲤微卫星引物中,有 11 对引物能对黄鳝 DNA 模板进行 PCR 扩增,并产生特异性带谱。引物 P1 的扩增产

物能作为区别湖南、广东和孟加拉 3 个不同地域的黄鳝种群的分子标记。

#### 3.2 黄鳝微卫星位点多态性分析

根据 Tajima 的 DNA 序列抽样分布理论,采用 10 个体的样本数量就具备充分的代表性<sup>[7]</sup>。本实验采用的每个样本的数量为 20 个,其结果具有较好的代表性。

微卫星 DNA 本身重复单位数的变异是形成微卫星位点多态性的基础。从理论上来说,每一个位点经 PCR 扩增后的等位基因数应小于或等于其倍数。但本项研究发现一对引物可以扩增出多条带现象。筛选的 11 对引物,共扩增出 90 个等位基因,每对引物扩增等位基因数在 3~13 条之间(表 3),平均每个位点有 5.6 个等位基因。其他学者的研究结果也出现了类似现象,如 Spruell 等<sup>[8]</sup> 研究强壮红点鲑 (*Salvelinus confluentus*) 的 4 个微卫星位点时发现每个微卫星位点的等位基因数有 2~10 个; Meldgaard 等<sup>[9]</sup> 发现茴鱼 (*Thymallus thymllus*) 微卫星 DNA 每一位点的等位基因在 4~10, 种群特异性等位基因的频率 < 5%; Daemen 等<sup>[10]</sup> 研究欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 的 5 个微卫星位点也发现,每一个样品每一个位点的等位基因数为 9.6~12.4 个,平均每一个位点的等位基因数为 16.6 个; Nielsen 和 Sage<sup>[11]</sup> 发现虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的每个微卫星位点的等位基因数在 1~20 个的区间变动,这一现象出现的原因尚需进一步研究。

#### 3.3 黄鳝种群间遗传多样性

微卫星分析结果(表 3~表 5)显示,群体间的相似率以湖南黄鳝与广东黄鳝最高(91%),孟加拉黄鳝与湖南、广东黄鳝的相似率都低(孟加拉黄鳝与广东黄鳝相似率为 58.6%,孟加拉黄鳝与湖南黄鳝之间的相似率为 55.7%)。从变异度差异来看,群体间变异度(即遗传距离)以湖南黄鳝与广东黄鳝最低(0.09),广东黄鳝与孟加拉黄鳝次之(0.41),湖南黄鳝与孟加拉黄鳝之间的变异度最高(0.44)。据 Meldgaard 等<sup>[9]</sup> 采用 Shaklee 提出的鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离(D 值)分别为 0.90, 0.30 和 0.05,广东黄鳝与湖南黄鳝为同种生物不同种群间的差异(0.3 > D = 0.09 < 0.05),而孟加拉黄鳝与湖南、广东黄鳝为同属的不同种间的差异(0.9 > D 值 > 0.3)。

表 3 3 个黄鳝种群 11 个位点扩增的等位基因结构

Tab.3 Allelic structures for 11 microsatellite loci amplified in 3 populations of *Monopterus albus*

位点 locus	等位基因总数 total alleles	平均等位基因个数 mean allele	种群 population						
			h	g	m	h/g/m	h/g	h/m	g/m
Malb1	13	7.3	7	7	8	3	6	3	3
Malb2	11	6.7	7	7	6	3	5	3	3
Malb3	3	2.3	2	2	3	2	2	2	2
Malb6	16	10.0	13	9	8	5	9	5	5
Malb7	7	5.0	5	5	5	3	5	3	3
Malb8	6	5.7	6	6	5	5	6	5	5
Malb11	3	2.7	3	3	2	2	3	2	2
Malb12	11	9.0	11	10	6	6	10	6	6
Malb14	11	7.0	9	8	4	2	8	2	2
Malb19	3	2.7	3	3	2	2	3	2	2
Malb21	6	3.7	4	4	3	1	4	1	1
合计 total	90	62.0	70	64	52	34	61	34	34

注:h、g、m:分别表示来自湖南、广东和孟加拉的黄鳝种群的扩增的等位基因数;h/g/m:湖南、广东和孟加拉的黄鳝3个种群扩增的共同等位基因数;h/g:湖南和广东黄鳝种群的相同等位基因数;h/m:湖南黄鳝和孟加拉黄鳝种群的相同等位基因数;g/m:广东黄鳝和孟加拉黄鳝种群的相同等位基因数

Notes: h, g, m: amplified alleles of *Monopterus albus* from Hunan, Guangdong or Bengal, respectively; h/g/m: mutual alleles of *Monopterus albus* from Hunan, Guangdong and Bengal; h/g: mutual alleles of *Monopterus albus* from Hunan and Guangdong; h/m: mutual alleles of *Monopterus albus* from Hunan and Bengal; g/m: mutual alleles of *Monopterus albus* from Guangdong and Bengal

表 4 3 个群体内遗传相似率和变异度值

Tab.4 Genetic similarity and variability in the 3 populations

种群 population	相似率(%) similarity		变异度 variability	
	变化幅度 range	平均 average	变化幅度 range	平均 average
h	94.92 ~ 97.18	95.51	0.028 ~ 0.062	0.045
g	94.12 ~ 99.42	95.84	0.006 ~ 0.059	0.042
m	90.78 ~ 95.83	93.50	0.029 ~ 0.092	0.0625

表 5 3 个群体间遗传相似率和变异度值

Tab.5 Genetic similarity and variability between the 3 populations

种群 population	相似率(%) similarity		变异度 variability	
	变化幅度 range	平均 average	变化幅度 range	平均 average
h/g	71.4 ~ 100	91	0 ~ 0.286	0.09
h/m	28.6 ~ 90.9	55.7	0.091 ~ 0.714	0.443
g/m	28.6 ~ 90.9	58.6	0.091 ~ 0.714	0.414

从个体的大小和外形来看,湖南黄鳝和广东黄鳝十分相似的,而湖南、广东黄鳝与孟加拉黄鳝的形态相差较大。在外形上,湖南、广东黄鳝的个体较小,外形相似:鳃退化,背鳍、臀鳍退化成低皮褶,体黄褐色布满黑色小斑点;而孟加拉黄鳝个体较大,其外形差异也大:头部呈三角形,鳃部向外突出不完全退化,体色呈淡黄或黄褐色,无偶鳍,背鳍、臀鳍退化成低皮褶。从地理位置来说,湖南

和广东的位置相邻,而孟加拉离这两地的距离较远。Olsen 等<sup>[12]</sup>对银大马哈鱼 9 个微卫星位点研究也发现:银大马哈鱼种群间的基因距离与其栖息地的距离存在着强烈的一维线性关系。

综合本研究的微卫星分析结果、外形特征及地理位置,可以推测:广东黄鳝与湖南黄鳝为同一个物种的不同地理种群,而孟加拉黄鳝为同属中另一个种。

### 3.4 微卫星分子标记在鱼类种质资源研究中的意义

微卫星技术是建立在 PCR 基础上的常用 DNA 多态性分析方法,微卫星 DNA 本身重复单位数的变异是形成微卫星位点多态性的基础,经过精确设计的特异性引物,PCR 扩增的条带互不重叠<sup>[13]</sup>,微卫星扩增产物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染方法染色,条带清晰,多态性信息准确;微卫星技术重复性强,且在同一胶片上的序列梯度能提供分辨率达 1 bp 的微小差异<sup>[7, 13]</sup>,使微卫星结果精确度高,易于进行比较,充分显示微卫星技术的优越性。因此微卫星技术在鱼类种质资源的研究中也具有重要的应用前景。Spruell 等<sup>[8]</sup>采用 3 种不同方法研究强壮红点鲑 (*Salvelinus confluentus*) 种群遗传多样性时证实,微卫星分析结果与鲑异构酶分析及线粒体 DNA 分析的结果一致。

#### 参考文献:

- [1] 张繁荣,雷刚.几种不同体色黄鳝的脂酶同工酶的分析[J].江汉大学学报,2000,17(6):8-11.
- [2] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Acid Res, 1984, 12: 6463-6471.
- [3] 周莉,刘静霞,桂建芳.应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探[J].动物学研究,2001,22(4):257-264.
- [4] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Animal Genetics, 1997, 28: 129-134.
- [5] 石锐,郭长虹.聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法[J].生物技术,1998,8(5):46-48.
- [6] Lynch M. The similarity index and DNA finger printing [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7(2):478-484.
- [7] 邱涛,陆仁后,项超美,等. RAPD 方法对中华绒螯蟹长江、辽河、瓯江三群体的遗传多样性分析[J].淡水渔业,1997,27(5):3-6.
- [8] Spruell P, Hemmingsen A R, Howell P J, et al. Conservation genetics of bull trout: geographic distribution of variation at microsatellite loci [J]. Conservation Genetics, 2003, 4: 17-29.
- [9] Meldgaard T, Nielsen E E, Loeschcke V. Fragmentation by weirs in a riverine system: a study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system [J]. Conservation Genetics, 2003, 4: 735-747.
- [10] Daemen E, Cross T, Ollevier F, et al. Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers [J]. Marine Biology, 2001, 139: 755-764.
- [11] Nielsen J L, Sage G K. Microsatellite analyses of the trout of northwest Mexico [J]. Genetica, 2001, 111: 269-278.
- [12] Olsen J B, Miller S J, Spearman W J, et al. Patterns of intra- and inter-population genetic diversity in Alaskan coho salmon: implications for conservation [J]. Conservation Genetics, 2003, 4: 557-569.
- [13] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle action gene [J]. Am J Hum Genet, 1989, 44: 397-401.

## 欢迎订阅 2006 年《上海水产大学学报》

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的以水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要反映各学科科研成果,促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究等方面的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、简讯等,并酌登学术动态和重要书刊的评介等。

本刊为季刊,大 16 开,国内公开发行。每期单价:10.00 元。国际标准刊号:ISSN 1004-7271,国内统一刊号:CN 31-1613/S。国内邮发代号:4-604,国际发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 334 号,上海水产大学 38 信箱,邮编:200090

联系电话:021-65710892, 传真:021-65710232

E-mail: xuebao@shfu.edu.cn