

## 黑龙江乌苏里白鲑遗传多样性分析

梁利群,常玉梅,董崇智

(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)

**摘要:**本研究从50对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)的微卫星标记中筛选出在黑龙江乌苏里白鲑(*Coregonus ussruensis* Berg)基因组中扩增出的多态性 SSLP 标记12对。用其中的6对微卫星标记对15尾黑龙江乌苏里白鲑基因组DNA进行遗传检测。用2%的琼脂糖凝胶电泳检测微卫星引物的PCR扩增产物,计算6个SSLP基因座的等位基因频率、多态信息含量等。结果显示,最高等位基因频率的范围在0.375 0~0.538 5,最低为0.025 0,说明这个群体为多态群体(群体具有遗传多样性)。多态信息含量(PIC值)的范围在0.462 0~0.706 9,说明基因座为高度多态基因座。黑龙江乌苏里白鲑群体的杂合度范围在0.558 6~0.728 2,表明其遗传多样性程度处于中等偏上水平。从遗传多样性角度应引起重视,采取切实可行的措施对其遗传多样性加以保护。结合资源量下降的现实,建议在保护遗传多样性的前提下对其采取人工繁殖放流的方法扩大其种群数量。

**关键词:**黑龙江;乌苏里白鲑;种群;遗传多样性

**中图分类号:**Q959.466 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0501-05

黑龙江乌苏里白鲑(*Coregonus ussruensis* Berg)属北极淡水区系复合体的冷水性鱼类,栖息在水质澄清、砂砾底质、流速较大、水温低(1~20℃)的河流或山涧溪流,陆封型鲑鳟鱼类。为黑龙江水系特产的冷水性经济鱼类<sup>[1-2]</sup>。近年来其产量不断下降,捕捞群体的体重偏小<sup>[1-2]</sup>,捕捞群体中未成熟个体比例较高(23%)。初步认定捕捞群体结构发生变化的主要原因是由于捕捞强度过大和生态环境的改变引起的,因此充分了解黑龙江乌苏里白鲑的种群结构、遗传多样性现状、栖息环境状况,对其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由几个核苷酸为单位多次串联重复的DNA序列,这就是微卫星(microsatellite),也称简单序列重复多态性(simple sequence length polymorphism, SSLP)。由于几个碱基重复次数在同一物种的不同基因型间差异很大,所以SSLP标记快速发展成为一种替代RFLP标记的新型分子标记。这种标记具有种属保守性、共显性遗传及杂合程度高等特点。目前已广泛应用于建立分子标记连锁图、基因定位、品种鉴定

等领域<sup>[3-5]</sup>。

本研究应用虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)的SSLP标记分析了黑龙江中游抚远江段乌苏里白鲑基因组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,从基因组遗传多样性角度初步探讨了对黑龙江乌苏里白鲑进行保护性开发的必要性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 鳍条样品的采集

2001年10月10~30日,在黑龙江中游抚远江段大信滩的3层刺网(网长3.2 m,网高3.2 m,大外网目53 cm,内网目9.3 cm)渔获物中剪取15尾黑龙江乌苏里白鲑鳍条,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(乙醇可影响蛋白酶K的活性)。加入10倍于样品重量的本实

收稿日期:2004-01-07; 修订日期:2004-03-18.

基金项目:国家公益性项目(黑龙江界江、界河、界湖渔业资源调查).

作者简介:梁利群(1963-),女,研究员,鱼类基因工程育种与分子标记研究. E-mail:llq-1019@163.com

1)董崇智.黑龙江乌苏里白鲑渔业生物学研究[A].黑龙江水系界江界河界湖渔业资源调查报告汇编[C].2002,105-109.

2)张党民.乌苏里白鲑的生物学[A].黑龙江省渔业资源[C].1985,390-395.

实验室用于 PCR 反应的专用的 DNA 提取裂解液(成分: 10 mmol/L EDTA pH 8.0; 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K; 0.5% Sarcosyl), 50  $^{\circ}\text{C}$  消化 12 h, 用酚、氯仿和异戊醇混合液(体积比 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, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

**1.3.1 SSLP 引物** 网上查寻有关虹鳟的研究结果, 利用美国白头医学研究所的 Primer 3 程序设计 PCR 引物, 上海生工生物工程公司合成的虹鳟 SSLP 引物。实验从 50 对引物中筛选出 12 对有稳定扩增产物的引物, 其序列和结果见表 1。

表 1 SSLP 引物序列和基序  
Table 1 Sequence of SSLP primer and motifs

引物 Primer	序列 Sequence	重复序列 Motifs	引物 Primer	序列 Sequence	重复序列 Motifs
AF346691	gigggttggtcatgttggga cccataaccetaaaccaaac	(tg) <sub>13</sub>	AF375010	ggcttcaggatggagacaga gaggagaggatgaggggta	(ga) <sub>25</sub>
AF346694	cagcctaattggagtgctgt ccctcctgtgagacttca	(taga) <sub>18</sub>	G73803	gggatggggcggtaaatagat ttgtggcagtaagggttg	(ca) <sub>49</sub>
AF346679	ctccccagatcagacagg cctcaacatcggtaantagta	(ga) <sub>21</sub>	AF375033	caggcacacagctcagattg atcaacaaggctccctcc	(ga) <sub>27</sub>
AF346676	tgcctccatgagtaaacata tctctccttctctctctca	(ga) <sub>15</sub>	AF375034	gcatgtggagatggagagt atgaagccgtttagtgg	(ga) <sub>15</sub>
AF346673	ctctggggacagatggaaa cagagacacagcagggtca	(ca) <sub>14</sub>	AF346669	cctggttcaactagactacagc attactgtcctcggctcgc	(cat) <sub>15</sub>
AF346682	caggctttatggagccttag gaggagacttcagggaagc	(ga) <sub>18</sub>	AF375029	gcaggagctcatctgatcgl gaggagaaagagaggggga	(atct) <sub>19</sub>

**1.3.2 PCR 反应体系** 反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中包括模板 DNA 1.5  $\mu\text{L}$  (10 ng), 10 mmol/L Tris. HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.001% 明胶, 0.1% 的 Tween-100, dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 2 mmol/L, 引物为 0.2  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , Taq 酶为 1.5 U。

**1.3.3 PCR 反应程序** PCR 反应程序: 93  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 92  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 51 ~ 53  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 38 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min。PCR 反应在 PERKING Gene Amp PCR System 9700 型 DNA 扩增仪上进行。

### 1.4 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

PCR 扩增产物在含有 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB 的 2% 的琼脂糖凝胶中电泳, DNA 分子质量标准为 DL 2 000 DNA Marker (宝生物公司), 电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE, 在 5  $\text{V}/\text{cm}^2$  的电场条件下电泳 2 h, 用 GDS8000 凝胶成像仪 (UVP 公司) 进行分析鉴定。并用 1 Gelworks 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 ng 与 20 ng 之间)。

### 1.5 统计指标

计算微卫星基因座的等位基因频率 ( $F$ )、多态

信息含量 (PIC) 及基因杂合度 ( $H$ )。

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

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

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,  $j = i + 1$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 扩增结果

虹鳟属鲑科鱼类, 日本、美国以及欧洲对虹鳟的分子生物学研究比较早, 也比较深入, 目前已经建立了虹鳟的遗传连锁图谱。本研究中选用了 50 对虹鳟的 SSLP 引物对 15 尾黑龙江乌苏里白鲑样品进行 PCR 扩增, 有 12 对 SSLP 引物能扩增出清晰的带, 共产生 230 个扩增片段 (图 1), 平均每对引物扩增出 19.5 条。这表明在基因组研究领域借用分子生物学基础研究比较深入的同属、同科鱼的研究结果开展相关基因组遗传多样性检测分析是可行的, 具有广泛的适用性。



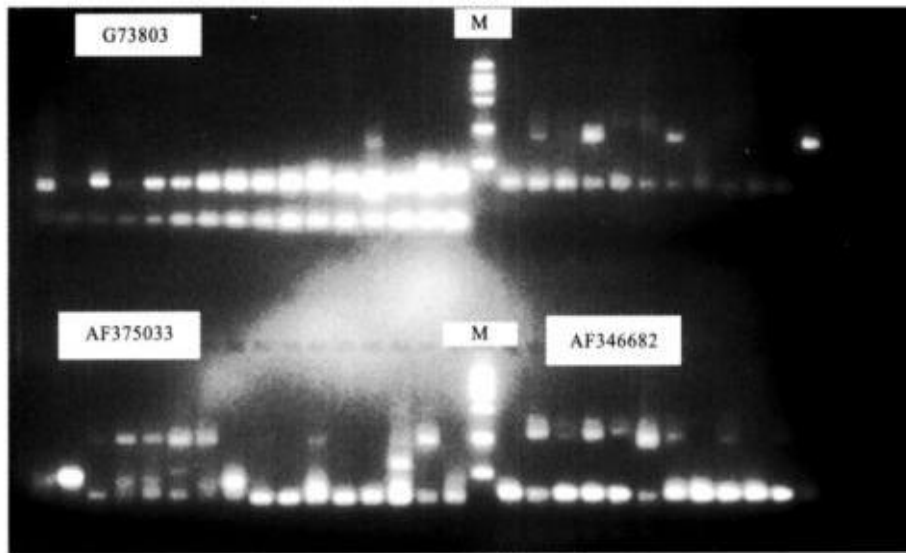


图 1 微卫星引物 AF375033、AF346682、G73803 对 15 尾黑龙江乌苏里白鲑基因组 DNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Individuals PCR results of genomic DNA of *Coregonus ussruensis* amplified by primers AF375033, AF346682 and G73803

## 2.2 遗传多样性分析

根据 12 对微卫星引物的扩增结果,选其中 6 个引物的扩增数据进行等位基因频率和多态信息含量统计分析(表 2)。在黑龙江乌苏里白鲑中检测到 AF375010 有 4 个等位基因,等位基因频率最高为 0.451 6。AF375092 有 4 个等位基因,等位基因频率最高为 0.384 6。AF346676 有 6 个等位基因,等位基因频率最高的为 0.375 0。AF346694 有 3 个等位基因,等位基因频率最高为 0.407 4。G73803 有 3 个等位基因,等位基因频率最高为 0.468 8。微卫星的多态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。其他的复等位基因是进化过程中等位基因突变形成的。因此 AF375010 基因座的 a 等位基因、AF346676 基因座的 a 等位基因、AF346694 基因座的 b 等位基因、AF375092 基因座的 a 等位基因、AF346673 基因座的 a 等位基因、G73803 基因座的 a 等位基因可能是黑龙江乌苏里白鲑最原始的等位基因。今后我们还将对此做进一步的验证。

多态信息含量是评估扩增片段多态性的一个指标。反映出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>[6]</sup>。经过推算黑龙江乌苏里白鲑的 PIC 值为 0.462 0 ~ 0.706 9,说明基因座

多为高度多态基因座。

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。本研究检测黑龙江乌苏里白鲑的基因的杂合度范围为 0.558 6 ~ 0.728 2,群体平均杂合度为 0.652 1。AF346673 基因座的遗传变异最大(0.728 2),G73803 最小。说明黑龙江乌苏里白鲑群体的遗传多样性程度处于中等偏上水平。从遗传多样性角度应引起关注,采取切实可行的措施对其遗传多样性加以保护。

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,采取有力措施保护物种特别是濒危物种的遗传多样性是非常必要的<sup>[7-8]</sup>。目前黑龙江乌苏里白鲑已被列入《中国濒危动物(鱼类)红皮书》<sup>[9]</sup>。从遗传多样性分析看,黑龙江乌苏里白鲑的遗传多样性也是不容乐观的。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的减少,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记繁殖群体的数量要保持在 200 ~ 500 尾,这样可避免遗传“瓶颈”的出现。

表 2 黑龙江乌苏里白鲑 6 个微卫星基因座统计学指标

Table 2 Six microsatellites statistic values for *Coregonus ussuriensis*

基因座 Locus	等位基因 Allele	基因频率 Gene frequency	基因杂合度 Heterozygosity	多态信息含量 Polymorphism information content
AF375010	a	0.451 6	0.649 4	0.642 6
	b	0.129 0		
	c	0.354 8		
	d	0.064 5		
AF346676	a	0.538 5	0.659 7	0.655 2
	b	0.115 4		
	c	0.153 8		
	d	0.076 9		
	e	0.038 5		
	f	0.076 9		
AF346694	a	0.370 4	0.647 4	0.601 8
	b	0.407 4		
	c	0.222 2		
AF375092	a	0.384 6	0.669 2	0.630 9
	b	0.359 0		
	c	0.025 6		
	d	0.230 8		
AF346673	a	0.375 0	0.728 2	0.706 9
	b	0.275 0		
	c	0.125 0		
	d	0.200 0		
G73803	a	0.468 8	0.558 6	0.462 0
	b	0.468 8		
	c	0.042 5		

由于种内的遗传多样性也是一个物种对人为干扰进行成功反应的决定因素,因此野生鱼类的遗传多样性对人类具有巨大的、不可替代的潜在价值。因此,保护野生鱼类的遗传多样性,将为人类生存提供广泛的选择余地,以应付未来环境的变化。黑龙江乌苏里白鲑作为一种珍稀名贵鱼类,对其遗传多样性进行保护,实质上也是为支持和改进渔业生产提供必要的技术保障。

#### 参考文献:

- [1] 任慕莲. 黑龙江鱼类[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社,1981.23-24.
- [2] 张觉民. 黑龙江鱼类志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995.56-59.
- [3] 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.
- [4] 樊叶杨, 庄杰云, 吴建利, 等. 应用微卫星标记鉴别水稻幼穗亚种[J]. 遗传, 2000, 22(6): 392-394.
- [5] 李云海, 肖 晗, 李春庆, 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.
- [6] 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 Genet, 1980, 32: 314-331.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 乐佩琦. 中国濒危动物(鱼类)红皮书[M]. 北京:科学出版社, 1998.41-42.

## Analysis of genetic diversity for *Coregonus ussruensis* Berg in Heilongjiang River

LIANG Li-qun, CHANG Yu-mei, DONG Chong-zhi

(Key Laboratory of Bioengineering Breeding of Northern Finfish Ministry of Agriculture, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

**Abstract:** *Coregonus ussruensis* Berg habituated in Heilongjiang River is an endemically economic fish. It has high value due to its higher fat content and fresher flesh. Recently, it has been listed in Red-Cover Book of Endangered Fishes because a small number of populations existed in nature. So, it is very urgent for researchers to protect this species with effective methods as soon as possible. However, the first thing should be done is to learn about genetic diversity of its nature population, and then, take some 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. We consulted nucleotide web sites and searched for 50 microsatellites derived from *Oncorhynchus mykiss*, and designed primers (Primer 3.0) by their flanking sequences, then applied to analyze the genetic diversity for *Coregonus ussruensis* by using PCR method. The PCR products were electrophoresed by 2% agarose gel, and the data like allelic frequency and heterozygosity were calculated and analyzed by statistic method. As a result, 12 markers were amplified polymorphisms on genomic DNA of *Coregonus ussruensis*, 6 markers of which were assessed for its genetic diversity. The results showed that: (1) The highest allelic frequency ranges from 0.375 0 to 0.538 5; the lowest is 0.025 0, which demonstrates *Coregonus ussruensis* belongs to a polymorphic population to date. (2) The PIC value (polymorphism information content) changes between 0.462 0 and 0.706 9, heterozygosity from 0.558 6 to 0.728 2, which indicates *Coregonus ussruensis* has relatively high genetic diversity. Therefore, considering the reduction of its populations, our study aimed at drawing more attention of authorities concerned to protect its genetic diversity rapidly and effectively. According to our study, we suggest to enlarge the population of *C. ussruensis* naturally through artificially reproduced exiling to make sure the size of effective breeding population more than 200 individuals, in order to avoid the occurrence of genetic neck.

**Key words:** Heilongjiang River; *Coregonus ussruensis* Berg; population; genetic diversity