

5种鲟、鳇鱼基因组DNA遗传多样性分析

梁利群, 孙效文, 董崇智, 尹家胜

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:以史氏鲟(*Acipenser schrencki*)、达氏鳇(*Huso dauricus*)俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedti*)、小体鲟(*A. ruthenus*)西伯利亚鲟(*A. baeri*)的基因组DNA为实验材料,用改进的DNA提取方法获得了完整的基因组DNA片段。通过25个SSLP及I型引物对5种鲟鳇鱼的基因组DNA进行PCR多态性引物筛选,获得11个能扩增出遗传多态性的有效引物,通过对5种鱼的PCR分析,平均遗传距离为0.748,遗传距离最大的为达氏鳇和小体鲟之间为0.935 5, DNA分析结果还显示,鲟鳇鱼的遗传多样性程度十分低下(47.93%)。同时建立了5种鲟鳇鱼的聚类图。

关键词: 鲟; 鳇; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: Q959.463

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)03-273-04

鲟、鳇属于大型长寿鱼类,由于其个体大,性成熟晚(鳇鱼为16龄,鲟鱼为9~11龄),且幼稚鱼期成活率低,补充群体量小,群体恢复慢^[1~2]。但从20世纪70年代开始,由于过度捕捞,我国黑龙江鲟、鳇鱼资源遭受破坏,已有多个种类被列为濒危动物。要开展鲟鳇鱼苗种生产和规模化养殖,就必须对其亲本进行遗传多样性分析。目前微卫星标记(SSLP)在斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[5]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[6~8]等基因组研究中已有广泛的应用。本研究以施氏鲟、达氏鳇、俄罗斯鲟、小体鲟和西伯利亚鲟的基因组DNA为实验材料,用目前在基因组研究方面广泛使用的微卫星标记及基因标记对这5种鱼的基因组DNA进行PCR分析,以求在DNA分子水平上探讨鲟、鳇鱼不同种属之间的遗传关系及遗传多样性,为进一步有序地开发和利用这些种质资源提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

史氏鲟(*Acipenser schrencki* Brandt)和达氏鳇(*Huso dauricus* Georgi)采自黑龙江抚远江段,俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedti* Brandt)、小体鲟(*A. ruthenus* Linnacus)和西伯利亚鲟(*A. baeri* Brandt)采自中国水产科学研究院北京房山

鲟鱼基地。每种鱼样品数为30尾,采集时间为2000年10月和2001年5月。

1.2 试剂

单核苷酸(dNTP)、分子量标准等均为TaKaRa公司产品;TaqDNA聚合酶、所用引物(表1)为Sangon公司产品;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器

DNA扩增仪,PE公司9600型;电泳仪,LKB公司2301型;凝胶成像系统,UVP公司GDS 8000。

1.4 基因组DNA提取

裂解液采用改进的配方(成份:10 mmol/L EDTA, 200 μg/mL Proteinase K, 0.5% Sarcosyl),取0.5 g尾鳍剪碎,加入500 μL裂解液,50℃消化12 h,94℃消化4 min,加等体积酚饱和溶液于机械手上缓慢转动抽提2 h,5 000 g离心5 min,吸上清,用酚-氯仿-异戊醇(体积比25:24:1)抽提2次,最后用氯仿-异戊醇(体积比24:1)抽提1次,将上清加入2倍体积的无水乙醇沉淀,15 000 g离心20 min,再用70%乙醇洗涤2次,离心干燥机抽干,加入适量的1/10 TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)缓冲液溶解,4℃保存备用。

1.5 PCR反应

聚合酶链式反应(PCR)体系:反应体积为25 μL,其中含50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl(室温, pH=8.4), 1.5 mmol/L MgCl₂, 100 μg/mL 明胶, 顺反2个引物各0.25 μmol/L, 4种底物(dATP + dGTP + dCTP + dTTP)各200 μmol/L, 模板DNA 0.1 μg(模板DNA为每组30个样品混合建立的基因组DNA库), Taq DNA聚合酶1 U。反应条件为

收稿日期:2001-09-27。

基金项目:国家科技部种质资源保存项目;国家社会公益类研究项目。

作者简介:梁利群(1963-),女,副研究员,从事鱼类基因工程育种与分子生物学研究。

94 ℃ 预变性 3 min, 循环设置为 92 ℃ 变性 30 s, 51 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 38 个循环, 然后 72 ℃ 延伸 5 min, 置于 4 ℃ 冰箱保存。

1.6 电泳及图像采集

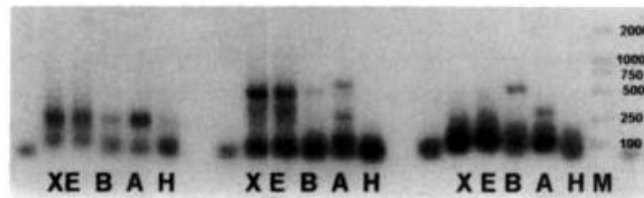
将 PCR 扩增产物在 0.5 × TBE 配制的 1.5% 琼脂糖凝

胶中电泳分离, 琼脂糖凝胶中 EB 的终质量浓度为 0.5 mg/L。3 V/cm 恒压下电泳 2 h。电泳结束后用 GDS8000 凝胶成像系统对凝胶进行拍摄保存, 并用 GelWorks1D 软件包(3.0 版本)对每组扩增带 DNA 含量进行估算(图 1)。

表 1 基因组扫描分析所用标记引物

Table 1 Information about the marker primer used in genomic scanning

标记 Marker	退火温度/℃ T_A	反应条件/(mmol·L ⁻¹) Enzyme - Mg	顺向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
Aox9	51	1U-2.5	TGGGTGCTGAAACATAGCCAG	ACATTGTTTGGTAGGCCAGC
Aox10	51	1U-2.5	GCCTAGGCTACATGCATCTGT	AACGACGGACGTCAGATTTC
Aox23	51	1U-2.5	AAGCATTGATGCAGTGTGCT	TGTTAGCTTAACCATGAATTGTGAC
Aox27	51	1U-2.5	ATGGCAGAAAAGCTTGCAAT	TCCTGGGATGACATTCACAA
Aox45	51	1U-2.5	CCAATAGTTTCCAACGCAGG	TTGTGCTCCTGCTTTTACTGTC
LS-62	51	1U-2.5	CGGAGACGACAGAACCCAAAGACAG	CCCAGCCCTAAGATTACCTT
LS-54	51	1U-2.5	CAAACCTGAATTATGCAAAACCG	GGGAATTCTGTGCAGACAA
LS-57	51	1U-2.5	GCAGAGTAGAGCAGGAACGG	GCCTGGGAAGACACGTACAG
LS-58	51	1U-2.5	GATCCGTTGAGTGATTGGTA	GGGATCATTGTCTCTGCTGAA
C88375	51	1U-2.5	CGAGATGAGTGAGGAGAGGC	CCTCCAGTTCTCTGGGATCA
C88371	51	1U-2.5	AAAATGCCGGGAACAAGTTA	TGCATCATCCACATCCACTT



07/03/01 15:22:14 Integrated 1 frames Brightness 3.06 Contrast -1.00 Processed

图 1 5 种鲟鱼 DNA 指纹图

Fig. 2 Genomic DNA fingerprints of 5 species of Acipenser

A—史氏鲟 *A. schrencki*; H—达氏鳇 *H. douricus*; E—俄罗斯鲟 *A. gueldenstaedti*; X—小体鲟 *A. ruthenus*; B—西伯利亚鲟 *A. baeri*

1.7 数据处理

数据的采集: 经电泳获得的基因指纹图谱, 在同一电泳迁移位置上, 按 DNA 带的有无进行统计, 有 DNA 扩增条带的计为“1”, 无带的计为“0”。按公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算物种 X 和物种 Y 间的遗传相似系数(同源性), 其中 N_{xy} 为 X、Y 两个体共享的 SLP 和 I 型(基因)标记数, N_x 、 N_y 分别为 X 和 Y 个体拥有的 SLP 和 I 型标记数。任意两个体间的遗传差异用遗传距离指数 $P(P = 1 - F)$ 衡量。用 UPGMA 法对所得数据进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

用 25 个 SLP 及 I 型引物对 5 种鲟鳇鱼的基因组 DNA 进行 PCR 多态性引物筛选, 最后筛选出 11 个能扩增出多态性的引物对 5 种鱼的基因组 DNA 进行 PCR 分析, 并获得其 DNA 指纹图(图 1)。11 个引物在上述 5 种鲟鳇鱼共扩增出

169 条 DNA 带, 平均每个引物扩增出 15.36 条带。多态性条带 81 条, 平均每个引物有 7.36 条。其多态位点率为 47.93%。

2.2 遗传距离指数及数据分析

根据 Nei 指数法得出 5 种鲟鳇鱼间的遗传距离(表 2)。从表 2 可以看出, 尽管史氏鲟、西伯利亚鲟、俄罗斯鲟及小体鲟同为鲟鱼属, 但其遗传相似程度却有很大的差异, 西伯利亚鲟与史氏鲟尽管生活在水域, 但从分子遗传学角度分析其遗传相似程度较与俄罗斯鲟和小体鲟却有更大的相似性($F = 0.5455$); 俄罗斯鲟与小体鲟的遗传距离较小($P = 0.4783$); 而达氏鳇与史氏鲟尽管分属两个不同的属(鳇属和鲟属), 但它们的遗传距离相对较小($P = 0.5652$), 可能与它们生活在同一水域有关, 因为环境变异也是影响其发生遗传变异的一个重要因素, 加之生活习性相近, 繁殖时间相同, 遗传基因在一定程度上可能发生了交流, 致使其有很大的遗传相似性。有文献报道黑龙江水域存在鲟鳇自然

杂交种群^[9]。

2.3 聚类分析

根据 PCR 扩增带同源性的遗传距离矩阵(表 2),用 UPGMA 法对 5 种鲟鳇鱼的亲缘关系进行了聚类分析(图 2)。5 种鲟鳇鱼分为 2 个组,平均遗传距离为 0.748,遗传距离最大的为达氏鳇和小体鲟之间为 0.935 5。达氏鳇、史氏鲟与西伯利亚鲟为 1 个组,达氏鳇与西伯利亚鲟的遗传距离为 0.931,与史氏鲟的遗传距离为 0.565 2。在聚类图上,史氏鲟与西伯利亚鲟处在同一亚组,而达氏鳇独处于另一亚组,表明达氏鳇(鳇属)与史氏鲟、西伯利亚鲟(鲟属)为科内属间关系,这与鱼类分类学的分类结果一致。

俄罗斯鲟与小体鲟同处于 1 组,2 者的亲缘关系较其它种近,其遗传距离为 0.478 3。

3 讨论

3.1 鲟鱼的遗传多样性

通过 DNA 分析结果显示,鲟鱼的遗传多样性程度十分低(47.93%),较低的遗传多态位点率反映了鲟鱼本身的遗传多样性贫乏,这对鲟鱼的生存十分不利。鲟鱼遗传多样性贫乏可能也是其难以适应外界环境变化从而衰退致危的重要原因。如果用数量较少的亲鱼进行批量苗种生产,继而近交将产生“瓶颈”效应。所以,在人工繁殖生产苗种和进行人

工放流之前应加强对亲鱼的遗传多样性分析,从而选择遗传多样性丰富的个体进行,否则遗传多样性的贫乏会对鲟鱼的生态保护及规模化生产产生不可弥补的后果。

表 2 5 种鲟、鳇鱼遗传相似性和遗传距离

Table 2 Genetic similarity indices and Nei's genetic distances of five species of *Acipenser* and *Huso*

	达氏鳇 <i>H. dauricus</i>	史氏鲟 <i>A. schrencki</i>	西伯利亚鲟 <i>A. baeri</i>	小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedti</i>
达氏鳇 <i>H. dauricus</i>	1	0.4348	0.069	0.0645	0.0606
史氏鲟 <i>A. schrencki</i>	0.5652	1	0.5455	0.125	0.2
西伯利亚鲟 <i>A. baeri</i>	0.931	0.4545	1	0.213	0.2857
小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	0.9355	0.875	0.787	1	0.5217
俄罗斯鲟 <i>A. gueldenstaedti</i>	0.9394	0.8	0.7143	0.4783	1

注:表中上三角中的数字表示遗传相似性,下三角中的数字表示遗传距离。

Note: Figures above the diagonal represent genetic similarity indices and below the diagonal represent the genetic distances.

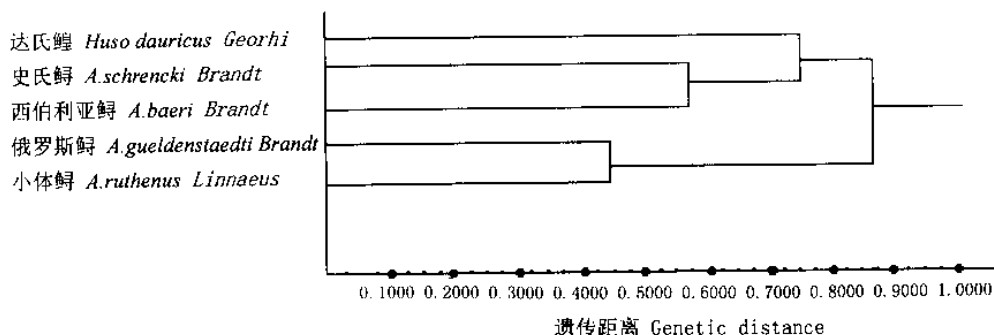


图 2 5 种鲟、鳇鱼的聚类图

Fig.2 DNA molecular dendrogram of 5 species of *Acipenser* and *Huso*

3.2 5 种鲟鳇鱼的遗传变异

相似系数是表示两个体间亲缘关系的参数,微卫星 DNA 遵循简单的孟德尔遗传方式,因此一级亲缘关系(如亲子关系和同胞关系)的个体间相似系数应为 0.5 左右,二级亲缘关系为 0.25 左右,由于相关的微卫星含有相同的长度,而且一些微卫星是纯合体,所以实际得出的相似系数可能会高出理论值。从表 2 可以看出,史氏鲟与西伯利亚鲟的遗传相似系数为 0.545 5,小体鲟与俄罗斯鲟的遗传相似系数为 0.521 7,这与相似系数的理论值相吻合,因此可以断定史氏鲟与西伯利亚鲟、小体鲟与俄罗斯鲟之间是种间关系。而达氏鳇与西伯利亚鲟、小体鲟、俄罗斯鲟的 F 值在 0.25 以下,

是二级亲缘关系,因此应为属间关系,尽管史氏鲟与达氏鳇的遗传相似系数为 0.434 8,但这个值没有达到一级亲缘关系 0.5,所以从这个角度将其归为属间关系。以上结果与经典鱼类分类学将西伯利亚鲟、小体鲟、俄罗斯鲟及史氏鲟归为鲟属,达氏鳇归为鳇属是一致的。但是从表 2 也可看出史氏鲟与小体鲟、俄罗斯鲟的遗传相似系数分别为 0.125 和 0.2,西伯利亚鲟与小体鲟、俄罗斯鲟的遗传相似系数为 0.213 和 0.285 7,这说明史氏鲟、西伯利亚鲟和小体鲟、俄罗斯鲟应该归为两个属,既史氏鲟、西伯利亚鲟为一个属,小体鲟、俄罗斯鲟为一个属。这与传统的鲟鱼分类相矛盾,但分子遗传学研究是从遗传物质本身对物种间的遗传差异进行

研究,从而弥补了传统分类学单从表形特征对物种进行定性分类的缺陷。针对这一结果我们将进行更深入的研究。

通过本实验可以看出,微卫星标记和基因标记能较为客观地反映5种鲟鲤鱼的遗传多样性及相互关系,它应用于鲟鲤鱼的分子分类是可行的。微卫星标记对于鲟鲤鱼的种质鉴定、分类及遗传多样性分析是一种有效手段。因此,将微卫星标记、基因标记与传统的资源分类、鉴定相结合,进行种质鉴定、遗传多样性分析必将促进鲟鲤鱼的有序合理开发利用、保护和科学的进行资源管理。

致谢:在鱼类样品的采集工作中,得到了孙大江研究员和丘岭泉、吴文化等同仁的帮助,谨表谢意。

参考文献:

- [1] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 1995. 34 - 36.
- [2] 石振广, 王云山, 李文龙. 鲟鱼与鲟鱼养殖[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 2000.
- [3] Aliah R S, Takagi M, Dong S, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Fisheries Science, 1999, 65(2):235 - 239.
- [4] McConnell S, Hamilton L, Morris D, et al. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east stocks of Atlantic salmon[J]. Aquaculture, 1995, 137:19 - 30.
- [5] Postlethwait J H. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map[J]. Nature genetics, 1998, 18:345 - 349.
- [6] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼遗传连锁图谱(初报). 中国水产科学, 2000, 7(1):1 - 5.
- [7] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选[J]. 动物学研究, 2001, 22(3):238 - 241.
- [8] 孙效文, 梁利群. 斑马鱼 SSLP 标记检测鲤鱼种间的遗传多态性[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2):5 - 6.
- [9] 任慕莲. 黑龙江鱼类[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社, 1981. 9 - 10.

PCR analysis on genetic diversity of five species of *Acipenseridae* and *Huso*

LIANG Li-qun, SUN Xiao-wen, DONG Chong-zhi, YIN Jia-sheng

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: The individual *Acipenser schrencki* and *Huso dauricus* were collected from Heilongjiang River, and the *A. guldenstaedti*, *A. ruthenus* and *A. baeri* were from the culture base in Beijing, each 30 individuals. Twenty - five SSLP primers and five gene primers of common carp were used to conduct the PCR polymorphic primer selection on the complete DNA of the five species, but only 11 effective primers were selected for PCR amplification. The results show that the genetic variation between *Acipenseridae* and *Huso* is extremely low (47.93%) with the mean genetic distance of 0.748. The biggest genetic distance presented between *H. dauricus* and *A. ruthenus*, which was 0.935. Meanwhile, the DNA molecular dendrogram of the five species is constructed herein.

Key words: *Acipenseridae*; *Huso*; SSLP; genetic diversity

《淡水渔业》2003 年征订启事

《淡水渔业》杂志由中国水产学会和长江水产研究所主办, 1971 年创刊。本刊 2003 年仍为国际流行大 16 开, 正文 64 页, 刊登内容仍然以渔业实用生产技术为主, 适当报道具有实用价值的科研新成果及渔业动态信息, 更加贴近渔业生产, 贴近渔民。

《淡水渔业》为双月刊, 每半月 5 日出版, 每册定价 5 元, 全年 6 期 30 元。为方便广大读者, 仍采用两种订阅方式: ①可在当地邮局订阅, 邮发代号: 38 - 32, 国内统一刊号: CN42 - 1138。②可直接汇款到杂志社订阅(可随时订阅全年杂志。地址: 湖北省荆州市江汉北路, 邮政编码: 434000; 电话: (0716) 821277 - 3017, 传真: (0716) 8228212。欢迎新老读者订阅, 欢迎广大作者惠寄稿件, 欢迎新老客户刊登各种广告。