

# 长臀鲩遗传多样性的微卫星标记分析

程 飞<sup>1,3</sup>, 叶 卫<sup>2</sup>, 叶富良<sup>1</sup>, 谢松光<sup>3</sup>, 龙翠华<sup>4</sup>

(1. 广东海洋大学, 广东湛江 524025 2. 广东罗非鱼良种场, 广州 511453  
3. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072 4. 武汉市实验学校, 武汉 430014)

**摘要:** 利用 55 对微卫星引物对珠江和海南长臀鲩基因组 DNA 进行了扩增, 有 23 对能扩增出清晰条带, 其中有 11 对在珠江长臀鲩中表现多态性, 9 对在海南长臀鲩中表现多态。这些多态性位点的等位基因数在 2~4 之间, 平均等位基因数 2.91 个。结果显示: 珠江长臀鲩的平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 是 0.45, 平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 是 0.46, 平均多态信息含量 ( $PIC$ ) 为 0.377; 海南长臀鲩的平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 和平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 分别是 0.58, 0.53, 平均多态信息含量 ( $PIC$ ) 为 0.426。两群体间的遗传相似度为 0.875, 遗传距离为 0.133。

**关键词:** 长臀鲩 (*Cranoglanis boudierus*); 微卫星标记; 遗传多样性

**中图分类号:** Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6907(2007)06-0061-04

## Genetic Diversity of *Cranoglanis boudierus* with Microsatellite Markers

CHENG Fei<sup>1,3</sup>, YE Wei<sup>2</sup>, YE Fu-liang<sup>1</sup>, XIE Song-guang<sup>3</sup>, LONG Cu-hua<sup>4</sup>

(1. Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524025

2. Guangdong Oreochromis Breeding Farm, Guangzhou 511453

3. Institute of Hydrobiology, Wuhan 430072; 4. Wuhan Experimental School, Wuhan 430014)

**Abstract** 55 pairs of microsatellite primers were employed to amplify the genome of Pearl River *Cranoglanis boudierus* and Hainan *C. boudierus*. 23 pairs of primers can amplify legible band. Of these 23 primers pairs, 11 showed polymorphism in Pearl River *C. boudierus* and 9 showed polymorphism in Hainan *C. boudierus*. The number of alleles on the polymorphic locus was 2~4 and the average was 2.91. The results showed for Pearl River *C. boudierus*, the average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.45, the average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.46, and the average polymorphism information content ( $PIC$ ) was 0.377; For Hainan *C. boudierus*, the averages of  $H_o$ ,  $H_e$  and  $PIC$  were 0.58, 0.53 and 0.426, respectively. The genetic similarity of these two populations was 0.875 and the genetic distance was 0.133.

**Key words** *Cranoglanis boudierus*; microsatellite marker; genetic polymorphism

长臀鲩 (*Cranoglanis boudierus*) 隶属于鲇形目 (Siluriformes) 长臀鲩科 (Cranoglanididae) 长臀鲩属 (*Cranoglanis*), 为东亚特有种, 俗称骨鱼, 是我国名贵经济鱼类。其主要分布于中国珠江水系、海南岛、云南的元江水系, 国外仅见于元江下游越南北部的红河水系<sup>[1]</sup>。目前, 国内对长臀鲩的研究多集中在养殖和基础生物学方面<sup>[2]</sup>。长臀鲩天然群体资源日益枯竭, 已被列为易危物种<sup>[3]</sup>, 且对其的分类存在争议<sup>[1]</sup>。因此, 开展长臀鲩分子标记的研究, 对长臀鲩的分类、种质保护和合理利用具

有重要意义。

微卫星 (microsatellite) 是由 1~6 个碱基对组成的短串联重复序列, 分布于真核生物整个基因组。微卫星标记被认为是物种遗传多样性评估的理想分子标记之一。利用已报道的鱼类微卫星引物来研究近缘种是微卫星标记应用的是一种行之有效的方法<sup>[4]</sup>。本实验利用已发表的微卫星引物对长臀鲩进行了扩增, 筛选出了多态性较高的微卫星位点, 并对珠江和海南长臀鲩的群体遗传结构进行了研究, 旨在为深入开展长臀鲩遗传研究提供参考资料。

收稿日期: 2007-06-11

资助项目: 广东省科技重大专项 (2005A20105001)

第一作者简介: 程飞 (1977-), 男, 汉族, 湖北黄陂人, 硕士研究生, 专业方向为水产经济动物生物学及种苗工程。

通讯作者: 叶卫, E-mail: yoweii19585@tm.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与 DNA 提取

珠江长臀鲮 30尾采自广东罗非鱼良种场, 海南长臀鲮 30尾采自于海南南渡河。实验鱼活体带回实验室, 取全血 1 mL 以 ACD (acid-citrate-dextrose) 抗凝,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。应用 DNA 提取试剂盒 (组织 DNA 提取试剂盒, TANGEN) 从血液中提取基因组 DNA。具体操作按试剂盒说明书进行。将得到的 DNA 溶于 TE 缓冲液中备用。

### 1.2 引物选择

选取已发表的大口鲮和鲤科鱼类的 55 对引物<sup>[4-7]</sup>进行长臀鲮基因组 DNA 的扩增。

### 1.3 PCR 反应体系

PCR 反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$  buffer 2  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTPs 0.3  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1 U, 25 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  1.2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板约 50 ng 正向、反向引物各 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 共循环 30 次, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  终末延伸 7 min。在此基础上, 根据各对引物扩增情况, 调整退火温度、 $\text{Mg}^{2+}$  等参数。扩增产物与上样缓冲液按体积比 5:2 混匀, 取

7  $\mu\text{L}$  混合物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳。电泳缓冲液为  $0.5\times\text{TBE}$ , 电压 140V 恒压, 电泳 3 h 左右。银染按 Sanguinetti 等<sup>[8]</sup>的方法进行。凝胶显影后在紫外凝胶图像处理系统中扫描、分析。

### 1.4 统计分析

用 ImageMaster D Elite (Version 3.01) 软件对谱带进行分析, 并辅以人工校正。实验统计了等位基因数 ( $\alpha$ )、有效等位基因数 ( $\alpha_e$ )、杂合度的观察值 ( $H_o$ ) 与无偏倚预期值 ( $H_e$ )、多态信息含量 (PIC)、遗传相似性系数 ( $I$ ) 和遗传距离 ( $D$ )。具体计算公式见参考文献 [9-10]。

## 2 结果

### 2.1 微卫星引物扩增结果

所选用的 55 对引物 (大口鲮和鲤科鱼类) 中有 23 对能得到稳定、可重复的 PCR 产物 (41.8%)。其中珠江长臀鲮有 11 对引物 (23.6%) 表现为多态性, 海南长臀鲮有 9 对引物表现多态 (图 1, 表 1)。这些多态性引物共扩增出 38 个等位基因, 等位基因数在 2~4 之间, 平均每个座位扩增出 2.91 个等位基因, 等位基因大小在 124 bp (koi20) 与 310 bp (HLJ15) 之间 (表 2)。

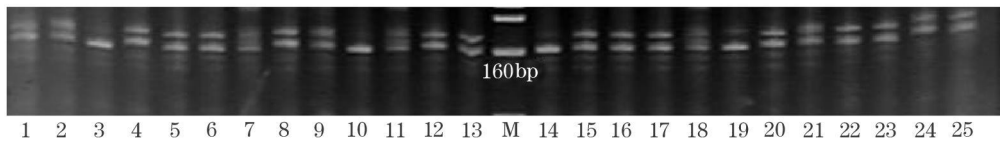


图 1 Koi20 在珠江长臀鲮群体中的扩增电泳图谱

M: DNA 标准分子量 pBR322 DNA  $M_{sp}$  1~25: 珠江长臀鲮群体 1~25 个样本

Fig 1 Electrophoresis patterns of PCR products amplified by Koi20 in Pearl River *C. boulderius*

M: pBR322 DNA  $M_{sp}$  molecular weight marker 1~25: individuals of Pearl River *C. boulderius* population

### 2.2 长臀鲮群体遗传多样性

珠江长臀鲮 11 个座位的多态信息含量为 0.061~0.673, 平均多态信息含量为 0.377, 其中 4 个座位的高于 0.5。海南长臀鲮 9 个座位的多态信息含量为 0.250~0.677, 平均多态信息含量为 0.411, 有 2 个高于 0.5。珠江长臀鲮观测杂合度为 0~0.7333, 平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 是 0.45, 平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 是 0.46, 海南长臀鲮的平均  $H_o$  和平均  $H_e$  分别是 0.58、0.53, 与珠江长臀鲮杂合度数值相近 (表 3)。根据等位基因频率计算出珠江长臀鲮和海南长臀鲮间的遗传相似度为 0.875, 遗传距离为 0.133。

## 3 讨论

自 1927 年 Koller<sup>[11]</sup>命名了新种海南长臀鲮后, 关于珠江长臀鲮和海南长臀鲮关系的争议就不断产生。Myers<sup>[12]</sup>认定 *C. sinensis* (珠江长臀鲮) 和 *C. multiradiatus* (海南长臀鲮) 是两个明显的物种, 并将这两个种归入一个独立的科, 即长臀鲮科。褚新洛等<sup>[13]</sup>根据形态差异将采自珠江水系的 *C. boulderius* 以及采自云南元江和海南的 *C. multiradiatus* 作为 *C. boulderius* 的两个亚种; Ng<sup>[14]</sup>在整理长臀鲮属鱼类时, 认为长臀鲮属有三个有效种, 即除珠江水系的长臀鲮 (*Cranoglanis boulderius*) 和海南诸水系的海南长臀鲮 (*Cranoglanis multiradiatus*) 外, *Anopleurtrapius hennici* 也为有效种。2005 年刘彩霞等<sup>[11]</sup>对长臀鲮的可测量性状进行了主成分分析, 认为长臀鲮属鱼类只存在一个有效种。Thompson<sup>[15]</sup>研究认为: 同科属群体间遗传相似系数在 0.1~0.5 之间; 不同

表 1 珠江长臀鲩和海南长臀鲩 11 个微卫星座位的等位基因频率  
Tab. 1 Allele frequencies of 11 microsatellite loci in *C. boudierus*

座位	等位基因	等位基因频率		座位	等位基因	等位基因频率	
		珠江长臀鲩	海南长臀鲩			珠江长臀鲩	海南长臀鲩
K <sub>o</sub> 20	1	0.288	0.200	HLJ21	1	0.412	0.453
	2	0.192	0.236		2	0.588	0.547
	3	0.365	0.145	HLJ22	1	0.019	0.108
	4	0.154	0.418		2	0.577	0.811
HLJ3	1	0.519	0.667	3	0.269	0.054	
	2	0.058	0.026	4	0.135	0.027	
	3	0.173	0.051	HLJ23	1	0.968	0.527
	4	0.250	0.256		2	0.032	0.473
HLJ15	1	0.032	0.000	HLJ33	1	0.415	0.227
	2	0.968	0.483		2	0.585	0.682
	3	0.000	0.517	3	0.000	0.091	
HLJ20	1	0.612	0.588	HLJ36	1	0.211	0.000
	2	0.388	0.412		2	0.789	1.000
HLJ18	1	0.086	0.000	HLJ38	1	0.348	0.000
	2	0.343	0.371		2	0.652	1.000
	3	0.057	0.229				
	4	0.514	0.400				

表 2 11 对微卫星引物在长臀鲩中的扩增条件及结果

Tab. 2 The amplification conditions and results of 12 microsatellite primers on *C. boudierus*

座位	引物序列 (5' - 3')	核心重复 序列	退火温度 (°C)	退火时间 (s)	等位基因大小 (bp)	等位 基因数	Mg <sup>2+</sup> 浓度 (mmol/L)
K <sub>o</sub> 20	F TGCCCTCTCTTTCCTCA CAGGCTTCAA CACAAA CACA	GGGA	50	30	124~ 150	4	1.5
HLJ3	F AAGCAACGCTGAAAGGTA CACGCCCTCACTCTTATT	GT	53	30	250~ 300	4	1.0
HLJ15	F TCGGGTGTCCA CATACTTT ATGGTCGTGATTGATG C	AC	56	30	270~ 310	3	1.2
HLJ18	F AGCTTCCCGTCTTTGT GCATA CTGTCCACCTCCT	AC	53	30	210~ 220	4	1.0
HLJ20	F TCCAACCA CCACCTGATA GCAGCCCAAGGTAATGTA	AC	54	30	170~ 195	2	1.2
HLJ21	F CGACGTAA CCTGTAATGC AGGTGAAA CCGTCTATCC	GT	52	35	160~ 180	2	1.0
HLJ22	F CAATGATGAGCGTGAGGT CAGGAGGTCTGTCTAAATGA	CA	53	30	190~ 205	4	1.0
HLJ23	F CCACTGAGCACAGGGTAA AGGGAGGTAGAGG CAAAA	CA	51	30	210~ 220	2	1.2
HLJ24	F CCACTGAGCACAGGGTAA AGGGAGGTAGAGG CAAAA	CA	51	40	260~ 270	3	1.2
HLJ33	F CAAGTTCTCATTTCCATAC TTCTCCCTGTTGCTCTGT	CA	55	35	128~ 136	2	1.5
HLJ36	F CACAATGCCCTGCTCA CA CTGCCCTTCTAAAAGCTCTACCA	CA	58	30	150~ 158	2	1.2
HLJ38	F GCACCCTAAGCCAAGCCT GATCCGA CGGCAA CAGTG						

表 3 长臀鲩 11 个微卫星座位遗传多态性  
Tab. 3 Genetic diversity the 11 microsatellite loci in *C. boudierus*

座位	有效等位基因数 ( $a_e$ )		观察值杂合度 ( $H_o$ )		期望杂合度 ( $H_e$ )		多态信息含量 ( $PIC$ )	
	珠江	海南	珠江	海南	珠江	海南	珠江	海南
Ko20	3.6	3.4	0.7333	0.8333	0.7471	0.7302	0.673	0.677
HLJ3	2.7	1.9	0.7333	0.3000	0.6513	0.4900	0.579	0.485
HLJ15	1.1	2.0	0.0333	0.9333	0.0940	0.5172	0.061	0.250
HLJ18	2.5	2.9	0.1667	0.1667	0.6207	0.6778	0.537	0.367
HLJ20	1.9	1.9	0.6333	0.7000	0.4900	0.4900	0.362	0.592
HLJ21	1.9	2.0	0.7000	0.7667	0.4900	0.5172	0.367	0.373
HLJ22	2.4	1.5	0.7333	0.2333	0.6034	0.3448	0.513	0.305
HLJ23	1.1	2.0	0.0333	0.8333	0.0940	0.5172	0.061	0.374
HLB3	1.9	1.9	0.3667	0.4667	0.4900	0.4900	0.368	0.412
HLB6	1.5	—	0.2667	—	0.3448	—	0.278	—
HLB8	1.8	—	0.5333	—	0.4598	—	0.350	—

物种间遗传相似系数在 0.2~0.8 之间; 同种群体内遗传相似系数在 0.8~0.97 之间。本研究显示长臀鲩和海南长臀鲩间的遗传相似度为 0.875, 遗传距离为 0.133, 所以根据本实验二者应同属一个有效种的不同群体。

多态信息含量 ( $PIC$ ) 是衡量位点多样性的一种较好的指标。在某一群体中, 当  $PIC > 0.5$  时该位点表现为高度多态; 当  $0.25 < PIC < 0.5$  时该位点表现为中度多态; 当  $PIC < 0.25$  时该位点表现为低度多态<sup>[16]</sup>。珠江长臀鲩 12 个座位中 5 个座位是高度多态基因座位, 5 个座位是中度多态基因座位。海南长臀鲩群体中有 2 个高度多态基因座位, 8 个座位是中度多态基因座位。这一结果表明, 两个长臀鲩群体的遗传多样性中度偏高。杂合度是度量群体遗传变异的另一个有效参数。珠江长臀鲩与海南长臀鲩的杂合度基本一致, 两个群体平均观测杂合度均小于 0.4, 平均期望杂合度分别是 0.45、0.46, 都符合 Hardy-Weinberg 定理中的随机交配群体杂合度不超过 0.5 的标准, 说明两个群体在当前的野生环境下种质资源较好, 具有一定的群体稳定性。两个群体的平均观测杂合度均低于各自相对应的平均期望杂合度, 表明群体中纯合子个体有一定的比例, 群体遗传多样性有下降的趋势。

#### 参考文献:

- [1] 刘彩霞, 彭作刚, 何舜平. 长臀鲩属鱼类多变量形态分析及物种有效性研究 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(5): 507~512
- [2] 周立斌, 刘晓春, 叶卫, 等. 促性腺激素释放激素类似物对长臀鲩脑垂体促性腺激素分泌的影响 [J]. 动物学研究, 2004, 25(5): 379~384.

- [3] 郁桐栢, 沈丽红. 长臀鲩繁殖生物学初步研究 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2005, 24(3): 267~270.
- [4] 林凯东, 罗琛. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究 [J]. 激光生物学报, 2003, 12(2): 121~127.
- [5] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 113~119.
- [6] 全迎春, 孙效文, 梁立群, 等. 磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记 [J]. 水产学报, 2006, 30(2): 185~191.
- [7] 刘静霞, 周莉, 赵振山, 等. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究 [J]. 动物学研究, 2002, 23(2): 97~105.
- [8] Sanguinetti J, Diasnebo E, Simpson J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biochemical techniques*, 1994, 17(5): 914~921.
- [9] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 山东近海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(6): 530~537.
- [10] 全迎春, 梁立群, 孙效文, 等. 斑马鱼微卫星分子标记检测鲤鱼种间多态性 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 300~304.
- [11] Koller O. *Fische von der Insel Hainan* [J]. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 1927, 41: 25~49.
- [12] Myers G S. On the fishes described by Koller from Hainan in 1926 and 1927 [J]. *Lingnan Sci J*, 1931, 10: 255~262.
- [13] 褚新洛, 陈银瑞, 周伟, 等. 云南鱼类志 (下册) [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 313.
- [14] Ng H H, Kottelat M. *Cranoglanis henrici* (Vailant 1893), a valid species of cranoglanid catfish from Indochina (Teleostei: Cranoglanididae) [J]. *Zoosystema*, 2000, 22(4): 847~852.
- [15] Thon J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic [J]. *Ann Rev Ecol Syst*, 1982, 13(1): 139~168.
- [16] 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(3): 31~34.