

三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析

杨太有¹ 关建义² 陈宏喜¹

(1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007; 2. 新乡医学院生命科学技术系, 新乡 453003)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术,对丹江口水库、青龙湖(河南)和宿鸭湖 3 个野生赤眼鳟群体 90 个个体的遗传多样性进行分析。10 个 ISSR 引物共获得 96 个扩增位点,其中多态位点 69 个,多态位点比例为 71.88%。3 个群体的多态位点比例分别为 68.13%、64.77%和 63.22%,遗传距离分别为 0.1885、0.1724 和 0.1711, Nei 基因多样性分别为 0.1509、0.1397 和 0.1385, Shannon 信息指数分别为 0.2575、0.2403 和 0.2372。3 个群体上述指标差异均不显著 ($p > 0.05$)。丹江口水库与青龙湖群体遗传距离最远(0.1581),丹江口水库与宿鸭湖群体次之(0.1429),青龙湖和宿鸭湖群体最近(0.1344)。UPGMA 聚类结果为青龙湖与宿鸭湖群体先聚在一起,其次是丹江口水库群体。结果表明:3 个赤眼鳟群体的遗传多样性均较丰富,但群体间地理遗传分化差异并不明显。

关键词: 赤眼鳟; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)04-0529-05

赤眼鳟 (*Squaliobarbus curriculus*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 雅罗鱼亚科 (Leuciscinae) 赤眼鳟属 (*Squaliobarbus*), 是广布中国主要水系的野生经济鱼类^[1]。由于其具有适应性广、生长速度较快、抗病力强、易于人工驯化养殖、适宜于高密度养殖及混养等特点,因而极具开发价值,近年来作为新的养殖品种越来越受到人们的重视。但国内外对赤眼鳟的研究仅限于形态分类、地理分布、年龄、生长和繁殖等生物学方面^[1-5],而对其遗传多样性的研究未见报道。

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 是建立在 PCR 反应基础上的一种新型的分子标记技术^[6]。它结合了 SSR 和 RAPD 技术的优点,具有模板需要量少、多态性丰富、实验成本低、操作简单、实验稳定性较高等优点,现已广泛应用于物种的种质鉴定、亲缘关系的分析和遗传多样性的检测^[7]。但在鱼类中的研究较少^[8-11]。本研究利用 ISSR 分子标记技术,分析了丹江口水库、青龙湖与宿鸭湖 3 个野生赤眼鳟群体的遗传多样性,为进一步研究赤眼鳟不同地理种群之间的遗传分化提供基础数据,同时也为赤眼鳟种质资源的评价、保护和合理利用提供遗传学上的依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用赤眼鳟于 2006 年 8、9 月分别采集丹江口水库(汉江库区的肖川)与丹江库区的香花和马蹬)、青龙湖和宿鸭湖,各 30 尾,均为野生。取背部肌肉用液氮保存运回实验室, -70℃ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取 取 0.5g 肌肉提取基因组 DNA,参考文献[12]方法,略有改动。提取后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用紫外分光光度计估算浓度和纯度,调整浓度至 30ng/μL, 4℃ 保存备用。

1.3 ISSR-PCR 扩增 实验所用 dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司, ISSR 引物购自南京生兴生物技术有限公司。

PCR 扩增在 Biometra PCR 仪上进行。总反应体积为 25μL, 内含 10×Taq Buffer 2.5μL、25mmol/L Mg²⁺ 2.0μL、10mmol/L dNTPs 0.5μL、10μmol/L Primer 1μL、5U/μL Taq 酶 0.2μL、30ng/μL 模板 DNA 1.5μL, 最终加灭菌双蒸水至 25μL。阴性对照不加模板 DNA。扩增程序为 95℃ 预变性 5min, 接着 94℃ 变性 45s, 52℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 90s 共 38 个循环, 最后在 72℃ 终延伸 7min。扩增产物检测用含 0.5μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行,

收稿日期: 2007-11-27; 修订日期: 2008-03-19

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0524030005); 河南省教育厅自然科学研究项目 (2006180017); 河南省动物学重点学科项目资助

作者简介: 杨太有 (1963—), 男, 汉族, 河南武陟人; 学士, 副教授; 主要从事鱼类遗传标记与分类研究

通讯作者: 杨太有, E-mail: yangtaiyou@yahoo.com.cn

用 ChampGel-1000凝胶图像处理系统观察、拍照。

1.4 数据统计与分析 在琼脂糖凝胶电泳图谱上,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为属于同一位点。统计各个样品的扩增带,有带记为1,无带记为0,建立(0,1)数据矩阵,对下列指标进行统计分析。

(1) 多态位点比例 $P = \frac{\text{多态位点数}}{\text{位点总数}} \times 100\%$ 。

(2) 群体内和群体间的遗传距离^[13] $D = 1 - S_o$ 。S为遗传相似系数。个体间遗传相似系数 $S_{xy} = \frac{2N_{xy}}{(N_x + N_y)}$ 。 N_{xy} 是个体 x和 y两个共有的带数, N_x 和 N_y 分别为个体 x和 y的扩增带数。群体内遗传相似系数是群体内所有的两个个体间相似指数的平均值。群体间遗传相似系数为两群体间任意两个体的相似系数的平均值。

(3) Nei的基因多样性 $H = 1 - \sum X_i^2$

(4) Shannon 信息指数 $I = - \sum X_i \ln X_i$,其中, X_i 为位点 i在某一群体中的出现频率。

以上分析采用 POPGENE Version1.32软件进行统计。用 SPSS11.5 (Statistical Package for Social Sciences)统计软件中的方差分析 (ANOVA)对以上指标进行显著性检验。

(5) 利用 TFGA 软件对 Nei遗传距离进行 UPGMA聚类分析。

2 结果

2.1 ISSR-PCR扩增结果

在供筛选的 77个引物中,有 10个引物扩增结果稳定、多态型高、重复性好。共扩增出 96条带,多态性带 69条,多态性比例 71.88%。每个引物扩增的条带数为 8—11条(表 1)。扩增片段大小在 200—2000bp之间(图 1)。

表 1 筛选引物序列和扩增结果
Tab. 1 The sequence of primers elected and amplification results

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比例 (%) Ratios of polymorphic loci
ISSR-32	(AG) ₈ AC	8	5	62.50
ISSR-33	(AG) ₈ AT	10	8	80.00
ISSR-34	(AG) ₈ AA	9	6	66.67
ISSR-57	(AG) ₈ TG	10	6	60.00
ISSR-58	(AG) ₈ GA	11	8	72.73
ISSR-59	(AG) ₈ GC	10	7	70.00
ISSR-62	(AG) ₈ CA	10	7	70.00
ISSR-63	(AG) ₈ CT	11	10	90.91
ISSR-65	(AG) ₈ CC	9	6	66.67
ISSR-75	(AGTG) ₄	8	6	75.00
Total		96	69	71.88

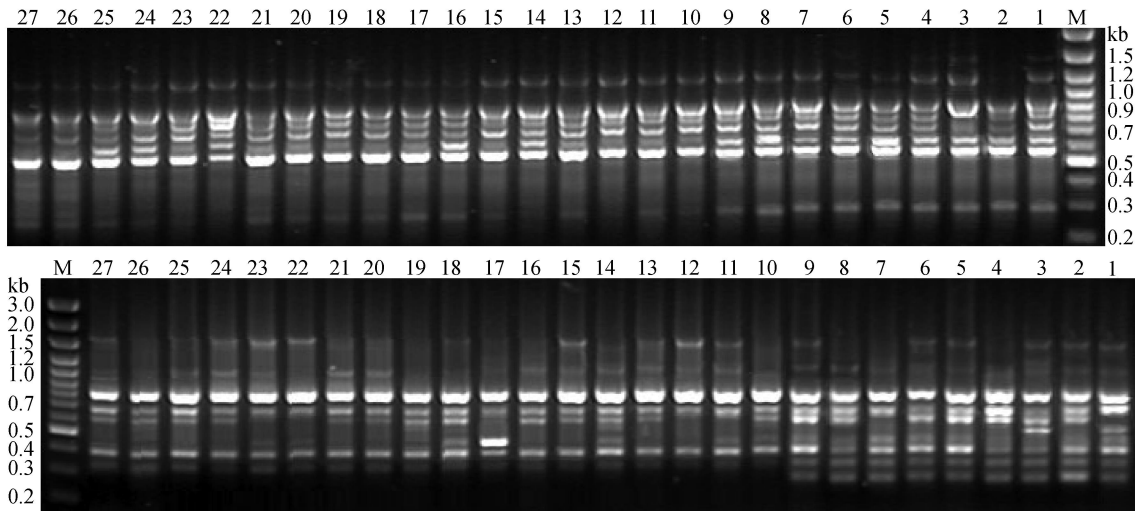


图 1 引物 ISSR-32和 ISSR-57对赤眼鳟 3个群体的扩增图谱

Fig. 1 The amplification patterns of primer ISSR-32 and ISSR-57 in three populations
M:分子标记 Marker; 1—9:丹江口水库个体 Danjiangkou Reservoir individuals; 10—18:青龙湖个体 Qinglong lake individuals; 19—27:宿鸭湖个体 Suyu lake individuals

2.2 遗传多样性分析

Nei的基因多样性和 Shannon 信息指数结果 (表 3个赤眼鳟群体的多态位点比例、遗传距离、 2)。

表 2 三个赤眼鳟群体的遗传多样性结果
Tab. 2 Results of genetic diversity of three populations

群体 Populations	丹江口水库 Danjiangkou Reservoir	青龙湖 Qinglong Lake	宿鸭湖 Suya Lake	F 检验 F-test
总位点数 Total loci	91	88	87	
多态位点数 Polymorphic loci	62	57	55	
多态位点比例 Ratios of polymorphic loci (%)	68. 13	64. 77	63. 22	$F = 0. 386 < F_{0. 05(2, 27)} = 3. 35$
遗传距离 Genetic distance	0. 1885 $\pm$ 0. 0717	0. 1724 $\pm$ 0. 0531	0. 1711 $\pm$ 0. 0588	$F = 0. 892 < F_{0. 05(2, 434)} = 3. 02$
Nei基因多样性 Nei's gene diversity	0. 1509 $\pm$ 0. 1132	0. 1397 $\pm$ 0. 1109	0. 1385 $\pm$ 0. 1142	$F = 0. 327 < F_{0. 05(2, 263)} = 3. 04$
Shannon信息指数 Shannon's information index	0. 2575 $\pm$ 0. 1855	0. 2403 $\pm$ 0. 1846	0. 2372 $\pm$ 0. 1890	$F = 0. 311 < F_{0. 05(2, 263)} = 3. 04$

结果表明,3个赤眼鳟群体的多态位点比例、遗传距离、Nei的基因多样性和 Shannon信息指数都较高,丹江口 >青龙湖 >宿鸭湖。这说明 3个赤眼鳟群体内个体间均具有较大的遗传差异,且丹江口水库群体相对突出。但方差分析表明群体间的差异不显著 ($p > 0. 05$)。

3个赤眼鳟群体间的遗传相似系数和遗传距离 (表 3)。结果显示,群体间的遗传距离较小,均小于群体内的遗传距离 (表 2)。

表 3 三个赤眼鳟群体间的遗传相似系数 (对角线上方)和遗传距离 (对角线下方)
Tab. 3 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among three populations

群体 Populations	丹江口水库 Danjiangkou Reservoir	青龙湖 Qinglong Lake	宿鸭湖 Suya Lake
丹江口水库 Danjiangkou Reservoir		0. 8538	0. 8669
青龙湖 Qinglong Lake	0. 1581		0. 8742
宿鸭湖 Suya Lake	0. 1429	0. 1344	

2.3 聚类分析

根据 Nei遗传距离将 3个群体进行 UPGMA 聚类 (图 2)。结果为青龙湖群体与宿鸭湖群体先聚在一起,其次是丹江口水库群体。

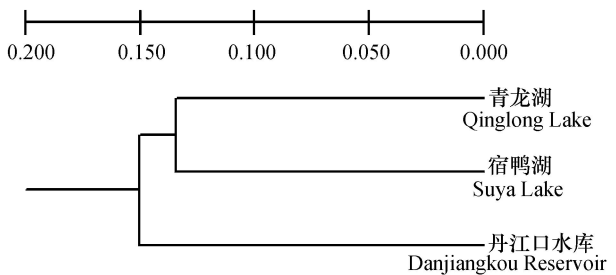


图 2 三个赤眼鳟群体的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of the three populations of *Squaliobarbus curriculus*

3 讨论

3.1 赤眼鳟群体内的遗传多样性比较

生物群体的遗传多样性是评价生物资源状况的一个重要依据,是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础。对种群内和种群间遗传多样性的认识在进行种质鉴定和亲本选择时具有重要的现实意义^[14]。但基于 ISSR 技术所反映的物种遗传多样性的定性迄今还没有一个明确的定量标准,也没有系统的研究记录可作比较。与相同技术对小黄鱼^[8]、牙鲆^[9]和刀鲚^[10]的研究结果比较,丹江口水库、青龙湖和宿鸭湖的野生赤眼鳟群体的多态位点比例、遗传距离、Nei的基因多样性和 Shan-

non信息指数均较高,说明3个野生赤眼鳟群体的遗传多样性较为丰富。虽然由于鱼类的分类地位及海洋鱼类与淡水鱼类在基因交流方面的不同,可能导致它们彼此之间在遗传分化水平上存在差异,但上述比较,在一定程度上能够间接反映出赤眼鳟的遗传多样性水平。

本研究的3个赤眼鳟群体均为野生,目前尚无增殖放流史,因而避免了近亲交配等因素对群体遗传多样性的不利影响,遗传结构多样性保存完好,可能有比较高的适应生存的能力,蕴藏着比较大的进化潜能及比较丰富的育种潜力。因此,应采取合理措施保护野生赤眼鳟资源,为其持续开发利用和选择育种提供保证。

3.2 赤眼鳟群体间的遗传距离比较

丹江口水库与青龙湖群体间的遗传距离为0.1581,与宿鸭湖群体间的遗传距离为0.1429,青龙湖与宿鸭湖群体间的遗传距离为0.1344,表明青龙湖与宿鸭湖群体亲缘关系较近,丹江口水库群体与青龙湖和宿鸭湖群体亲缘关系较远。但由于群体间的遗传距离较小,均小于群体内的遗传距离(0.1711—0.1885),且3个群体间的遗传距离差异均不显著,说明3个赤眼鳟群体间遗传差异不明显。

不同地理群体生物间现有的分布格局可能是由于地质变化、自然地理环境和气候条件差异等导致的^[15]。用于本实验的3个赤眼鳟群体分别采集于丹江口水库、青龙湖和宿鸭湖。丹江口水库主要分布于湖北省丹江口市和河南省淅川县,是亚洲第一大人工水库,水域面积750km²,属长江流域汉江水系。青龙湖位于河南省封丘县境内,是河南、山东沿黄流域最大的一处自然湖,与黄河仅一堤之隔,湖水面积1.5km²,属黄河水系。宿鸭湖水库位于河南省汝南县境内,是亚洲最大的平原人工水库,总面积420km²,属淮河流域洪汝河水系。三地之间直线距离最大约为380km,最小约为220km。由于3个赤眼鳟群体所处的水系不同,地理隔离完全,也未有引种记录,故几乎不存在种群间基因交流的可能。但由于它们所处的地理距离较近,同属古北界华北区与东洋界华中区南北过渡地带,气候属亚热带和温带的过渡类型,自然地理环境和气候条件差异不明显。因此,尽管3个赤眼鳟群体的遗传多样性较为丰富,但群体间的地理分化特征并不明显。

参考文献:

[1] Yang G R, Huang H J. Leuciscinae [A]. In: Wu X W (Eds),

The annals of Cyprinidae fishes in China [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press 1982, 52—53 [杨干荣, 黄宏金. 雅罗鱼亚科. 伍献文主编, 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科学技术出版社. 1982, 52—53]

- [2] Yang M S, Chen J A, Huang X X, et al Growth and population structure of *Squaliobarbus curriculus* in the Fuhe River [J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26 (6): 59—60, 63 [杨明生, 陈金安, 黄孝湘, 等. 府河赤眼鳟的生长和种群结构特征. 水利渔业, 2006, 26 (6): 59—60, 63]
- [3] Sun J J, Guo Y G, Li G F, et al An observation on the early fertilization of *Squaliobarbus curriculus* by scanning electron microscope [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13 (5): 740—743 [孙际佳, 郭云贵, 李桂峰, 等. 赤眼鳟精子入卵的扫描电镜观察, 中国水产科学, 2006, 13 (5): 740—743]
- [4] Long G H, Lin G, Hu D S, et al The Reproductive Biology of *Barbel Chub* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40 (5): 28—36 [龙光华, 林岗, 胡大胜, 等. 赤眼鳟的繁殖生物学. 动物学杂志, 2005, 40 (5): 28—36]
- [5] Fu C Z, Wu J H, Chen J K, et al Freshwater fish biodiversity in the Yangtze River basin of China: patterns, threats and conservation [J]. *Biodiversity and Conservation*, 2003, 12 (8): 1649—1685
- [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176—183
- [7] Xie J Y, Zhang Z B. Inter-simple sequence repeat and application in the research of genetic diversity [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2004, 24 (1): 71—75 [谢佳燕, 张知彬. ISSR标记技术及其在遗传多样性研究中的应用. 兽类学报, 2004, 24 (1): 71—75]
- [8] Xu G P, Zhong X M, Ding Y P, et al The research on genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* population from the southern part of the Yellow Sea [J]. *Marine Sciences*, 2005, 29 (11): 34—38 [许广平, 仲霞铭, 丁亚平, 等. 黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究. 海洋科学, 2005, 29 (11): 34—38]
- [9] Liu Y G, Chen S L, Li J, et al Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers [J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 565—572
- [10] Zhang Y, Hu Z H, Zhou Z G, et al Population genetic structure of *Coilia ectenes* sampled from Yangtze River estuary revealed by RAPD-PCR and ISSR-PCR markers [J]. *The Editorial Board for Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15 (4): 390—397 [张媛, 胡则辉, 周志刚, 等. 利用 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 标记技术分析长江口刀鲚的群体遗传结构. 上海水产大学学报, 2006, 15 (4): 390—397]
- [11] Maltagliati F, Lai T, Casu M, et al Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs) [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, 34: 625—634
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition) [M]. Beijing: Science Press 1995, 304—314 [萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社. 1995, 304—314]

- [13] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, **89**: 583—590
- [14] Chen L Z. Chinese Biodiversity: Current status and protective measures [M]. Beijing: Science Press 1993, 99—113 [陈灵芝. 中国的生物多样性: 现状及其保护对策. 北京: 科学出版社. 1993, 99—113]
- [15] Xiang X L, Xi Y L, Hu H Y. RAPD analysis of genetic diversity of different *Brachionus angularis* strains [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (3): 363—366 [项贤领, 席贻龙, 胡好远. 不同地理居群角突臂尾轮虫遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2006, **30** (3): 363—366]

GENETIC DIVERSITY OF THREE GEOGRAPHICAL POPULATIONS OF *SQUALIOBARBUS CURRICULUS* REVEALED BY ISSR ANALYSIS

YANG Tai-You¹, GUAN Jian-Yi² and CHEN Hong-Xi¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007;

2. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003)

Abstract: To assess the genetic diversity of the wild *Squaliobarbus curriculus*, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular marker was applied from Danjiangkou Reservoir, Qinglong Lake and Suyu Lake. Under predetermined optimal reaction conditions, 10 ISSR primers were selected from 77 ones. A total of 96 reproducible DNA fragments were amplified by the 10 ISSR primers from all the 90 individuals, in which 69 fragments were polymorphic, and the percentage of polymorphic loci was 71.88%. The percentages of polymorphic loci of three wild populations were 68.13%, 64.77% and 63.22%, respectively. The genetic distances were 0.1885, 0.1724 and 0.1711, respectively. The Nei's gene diversity was 0.1509, 0.1397 and 0.1385, respectively. Shannon's information indices were 0.2575, 0.2403 and 0.2372, respectively, which have no significant differences among the three populations ($p > 0.05$). The genetic distances of inter-population were 0.1581, 0.1429 and 0.1344, respectively. The farthest genetic distance occurred between Danjiangkou Reservoir and Qinglong Lake populations, and the nearest between Qinglong Lake and Suyu Lake. Unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis based on Nei's genetic distances showed that Qinglong Lake and Suyu Lake population assembled to one group firstly, and then did Danjiangkou Reservoir population. The results indicated that the percentages of polymorphic loci, the genetic distances, the Nei's gene diversity and Shannon's information indices of three populations of *Squaliobarbus curriculus* were higher. The inter-population genetic distances were low, and lower than the intra-population genetic distances. It showed that the three populations have high genetic diversity, but geographical genetic differentiation was not obvious among inter-population. The results also provided basic information for the protection and utilization of natural resource of *Squaliobarbus curriculus*.

Key words: *Squaliobarbus curriculus*; Genetic diversity; ISSR