

# 丁鲟养殖群体遗传多样性的 ISSR 分析

关建义<sup>1,2</sup>, 杨浩<sup>1</sup>, 陈欣<sup>1</sup>, 陈宏喜<sup>1</sup>, 杨太有<sup>1\*</sup>

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

**摘要** [目的] 分析丁鲟养殖群体的遗传多样性水平, 为其种质资源的评价、保护和合理利用提供依据。[方法] 利用简单重复序列区间扩增多态性 (ISSR) 分子标记技术。[结果] 选用 77 个随机引物对其 20 个个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 有 18 个引物可以扩增出稳定且清晰的条带, 共扩增出 115 条稳定的 DNA 位点, 片段大小在 100~2 000 bp, 其中多态性位点 14 个, 多态位点比例为 12.17%。个体间遗传距离为 0~0.137 6, 平均为 0.032 9±0.005 6。[结论] 丁鲟群体的遗传多样性水平较低。

**关键词** 丁鲟; 遗传多样性; ISSR

**中图分类号** Q 341 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08367-03

## ISSR Analysis of Genetic Diversity of *Tinca tinca* Cultured Population

GUAN Jian-yi et al (College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007)

**Abstract** [Objective] The study analyzed the genetic diversities level of *Tinca tinca* cultured population, which provided reference base for the evaluation, protection and utilization of its germplasm resources. [Method] The experiment was carried out by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) of molecular marker technique. [Result] 20 genome DNA were selected to PCR amplify from 77 ones, 18 ISSR primers can be amplified the stable stripes including 115 stable DNA sites and the fragments ranging from 100 to 2 000 bp, which had 14 polymorphism loci and the percentage of polymorphic loci was 12.17%. The genetic distance between individuals was from 0 to 0.137 6, and the average genetic distance was 0.032 9±0.005 6. [Conclusion] The results showed that the genetic diversity level of *Tinca tinca* was low.

**Key words** *Tinca tinca*; Genetic diversity; ISSR

丁鲟 (*Tinca tinca* Linnaeus) 属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科丁鲟属, 是一种广温性鱼类, 广布于欧洲各地, 在我国仅产于新疆额尔齐斯河流域的布尔津地区<sup>[1]</sup>。该鱼具有肉质鲜美、营养价值高、耐低氧、食性杂、易驯化养殖等优点, 近年来已逐渐成为我国重要的名特优水产养殖品种之一, 人工繁殖和养殖规模不断扩大。但由于逐级引种引起的近亲繁殖和人工养殖的生态环境单一等因素, 造成了基因流失、性状退化, 种质质量严重下降。在优良品种的培育过程中, 无论选育纯系品种或杂交育种, 均需选择具有较大遗传差异的亲本, 故遗传多样性是鱼类品种改良和选择育种的基础。因此, 很有必要对丁鲟养殖群体的遗传多样性进行研究。凌去非等<sup>[2]</sup>曾对我国丁鲟自然群体和捷克引进群体的遗传多样性进行了 RAPD 分析, 杨太有等<sup>[3]</sup>利用 RAPD 技术分析了丁鲟养殖群体的遗传多样性。

简单重复序列区间扩增多态性 (Inter Simple Sequence Repeat, ISSR) 是 Zietkiewicz 等<sup>[4]</sup>创建的一种新型分子标记技术, 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、试验成本低、操作简单、试验稳定性较高等优点, 现已被广泛应用于动植物的种质鉴定、亲缘关系的分析和遗传多样性的检测, 并开始逐渐应用于鱼类遗传多样性的研究<sup>[5-8]</sup>。笔者采用 ISSR 分子标记技术对丁鲟养殖群体的遗传多样性进行分析, 旨在为其种质资源的保护、遗传改良和合理利用提供遗传学上的依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 试验用丁鲟取自河南省安阳市水产研究所试验鱼塘 (2002 年从新疆引进苗种), 共 30 尾, 体长 14.32~18.82

cm, 体重 43.6~86.2 g, 暂养于水族箱中备用。

**1.2 基因组 DNA 的提取与定量** 参考 Sambrook J 等<sup>[9]</sup>方法, 取 0.1 g 丁鲟背部肌肉提取基因组 DNA。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 30 ng/μl, 4℃ 保存备用。

**1.3 ISSR 扩增及其产物检测** 试验用 ISSR 引物 (ISSR-1~ISSR-77) 购自南京生兴生物技术有限公司, Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 购自上海生工生物工程技术有限公司。PCR 扩增在 Biometra PCR 仪上进行。总反应体积为 25.0 μl, 含 10×Taq Buffer 2.5 μl, 25.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2.5 μl, 10 μmol/L Primer 1.0 μl, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μl, 5 U/μl Taq 酶 0.2 μl, 30 ng/μl 模板 DNA 1.5 μl。扩增程序为 95℃ 预变性 5 min; 接着 94℃ 变性 40 s, 48~57℃ (表 1) 退火 40 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 38 个循环; 最后 72℃ 终延伸 10 min。扩增产物检测用含 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳。用 ChampGel-1000 凝胶图像处理系统观察、拍照。

**1.4 数据分析** 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, 利用 POPGENE 软件对下列参数进行统计分析。①多态位点比例 ( $P$ ) = 多态位点数/位点总数 × 100%。②个体间遗传距离<sup>[10]</sup> ( $D$ ) = 1 -  $S$ 。S 是群体内所有 2 个个体间相似系数的平均值。个体间遗传相似度  $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。式中,  $N_x$  和  $N_y$  分别为第  $x$  和  $y$  个体拥有的 DNA 扩增的阳性标记数,  $N_{xy}$  是  $x, y$  2 个个体共有的阳性标记数。

## 2 结果与分析

从 77 个 ISSR 引物中筛选出 18 个扩增结果稳定的引物, 对 20 个丁鲟样本的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 共扩增出 115 条带, 片段大小为 100~2 000 bp, 其中多态性带 14 条, 多态性比例 12.17%。单个引物扩增的条带数为 4~8 条 (表 1)。图 1 为引物 ISSR-13 和 ISSR-55 的扩增图谱。根据

**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资助项目。

**作者简介** 关建义 (1969-), 男, 河南泌阳人, 讲师, 从事动物与分子遗传研究。\* 通讯作者, 教授, E-mail: yangtaiyou@yahoo.com.cn。

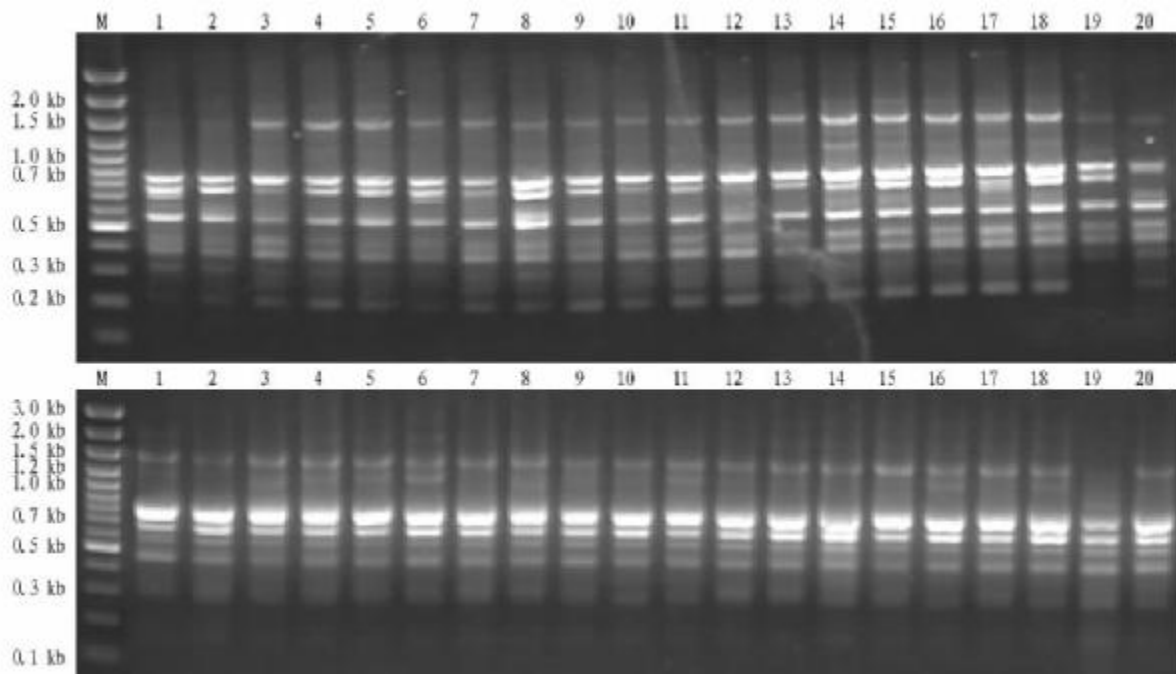
**收稿日期** 2009-03-17

POPGENE 进行统计,个体间遗传距离为  $0 \sim 0.1376$ ,群体平均遗传距离为  $0.0329 \pm 0.0056$ 。

表1 筛选引物序列、退火温度和扩增结果

Table 1 The sequence of primers elected, the annealing temperatures and amplification results

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences	退火温度//℃ Annealing temperatures	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比例//% Ratios of polymorphic loci
ISSR-4	(AC)8AG	52	7	1	14.29
ISSR-5	(AC)8TG	52	6	0	0
ISSR-9	(CTC)6	57	8	1	12.50
ISSR-13	(GGT)6	57	6	1	16.67
ISSR-24	(AC)8TC	52	7	1	14.29
ISSR-27	(TG)8CG	54	8	1	12.50
ISSR-32	(AG)8AC	52	6	1	16.67
ISSR-33	(AG)8AT	48	5	0	0
ISSR-34	(AG)8AA	48	4	0	0
ISSR-45	(AC)8GC	54	7	2	28.57
ISSR-49	(TG)8AC	52	7	1	14.29
ISSR-53	(TG)8GC	54	5	0	0
ISSR-55	(TG)8GG	54	8	2	25.00
ISSR-57	(AG)8TG	52	6	1	16.67
ISSR-58	(AG)8GA	52	7	0	0
ISSR-60	(AG)8GG	54	7	1	14.29
ISSR-62	(AG)8CA	52	5	0	0
ISSR-74	(ACTG)4	48	6	1	16.67
总数 Total			115	14	12.17



注:M为分子量标记,1~20为不同丁鲷个体。

Note: M. Marker(GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus); 1-20:20 different individuals of *Tinca tinca*.

图1 引物 ISSR-13(上)和 ISSR-55(下)的扩增图谱

Fig.1 The amplification patterns of primers ISSR-13 and ISSR-55

### 3 讨论

生物群体的遗传多样性是评价其种质状况的一个重要依据。认识鱼类种群遗传多样性,对于探讨鱼类遗传变异和基因流动以及人类活动对鱼类基因库的影响等问题均具有重要的参考价值。分子标记可直接反映某物种基因组中广泛发生的遗传变异,为研究种群的遗传多样性提供了有力的手段。

凌去非等<sup>[2]</sup>利用 RAPD 技术对新疆 2 个丁鲷野生群体的遗传多样性的分析显示,其多态位点比例分别为 24.00% 和 22.67%,个体间平均遗传距离分别为 0.1033 和 0.0965。

丁鲷养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析结果显示,其多态性比例和遗传距离分别为 9.23% 和 0.0286<sup>[3]</sup>。笔者利用 ISSR 技术对相同养殖群体的遗传多样性进行分析,结果显示,多态性比例和平均遗传距离分别为 12.17% 和 0.0329。对比上述研究结果表明,丁鲷养殖群体的遗传多样性水平明显低于野生群体。分析原因:首先,由于丁鲷在我国仅分布于新疆额尔齐斯河流域,地理分布范围较窄,环境条件差异不大,其自然群体自身的遗传多样性水平低。凌去非等<sup>[2]</sup>的研究结果也证明了这一点。其次,国内人工养殖的苗种多来源于新疆丁鲷人工繁殖的后代,由于在人工繁殖过程中选择的亲

鱼数量少,发生近交及“瓶颈”效应的可能性较大,加速了种质的同质化,势必引起养殖群体遗传多样性的下降。目前我国养殖鱼类“退化”现象较为普遍。对斜带髯鲷<sup>[11]</sup>等的遗传多样性研究表明,人工繁殖群体的遗传多样性均不同程度低于自然群体。对比 RAPD 和 ISSR 2 种技术分析相同丁鲟养殖群体的遗传多样性结果表明,后者的多态位点比例和平均遗传距离均略高于 RAPD。在分析翘嘴红鲌<sup>[7]</sup>和赤眼鲮<sup>[8]</sup>的遗传多样性时也存在该现象。这可能是由于 ISSR 引物含有重复序列,在 DNA 扩增过程中引物与目标序列结合时可能存在滑动现象,引起引物结合位点和两结合位点之间的片段长度差异<sup>[12]</sup>。

累代人工繁殖将造成其后代遗传多样性的降低,不仅会导致鱼类对环境的适应性、生长性能、繁殖性能的下降<sup>[13]</sup>,还有引起野生种群遗传结构发生改变的潜在危险(如人工放流)。因此,监测人工苗种的遗传变异及在养殖过程中的变化对于养殖的持续发展极为重要。丁鲟主要分布于欧洲,在我国仅分布于新疆额尔齐斯河流域的布尔津地区。因此,在引种、养殖和繁殖过程中,应借助遗传标记选择遗传距离大的个体进行繁殖,并以天然种群定期更换或补充亲鱼,以缩小“瓶颈”效应,降低近交系数,避免或延缓养殖群体遗传多样性的下降,提高丁鲟这一优良品种的可持续利用能力。

(上接第 8350 页)

个体的不同组织中表达的类型和程度不同。此外,同工酶

## 参考文献

- [1] 杨干荣,黄宏金. 雅罗鱼亚科[M]//伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海:上海科学技术出版社,1982:10-11.
- [2] 凌去非,李思发,乔德亮. 丁鲟不同群体间形态学差异与随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. 水生生物学报,2006,30(5):578-586.
- [3] 杨太有,陈宏喜,关建义,等. 丁鲟遗传多样性的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2008,36(2):111-113.
- [4] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20:176-183.
- [5] 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[J]. 海洋科学,2005,29(11):34-38.
- [6] 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(1/4):565-572.
- [7] 杨太有,陈宏喜,刘向奇,等. 丹江口水库翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 海洋与湖泊,2008,39(3):240-244.
- [8] 杨太有,关建义,陈宏喜. 三个地理群体赤眼鲮遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水生生物学报,2008,32(4):529-533.
- [9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社,1995:304-314.
- [10] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics,1978,89(3):583-590.
- [11] 王世锋,杜佳莹,苏永全,等. 斜带髯鲷野生与养殖群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 海洋学报,2007,29(4):105-110.
- [12] BRUFORD M W. Microsatellites and their application to conservation genetics[M]//SMITH T B, WAYNE R K. Molecular genetic approaches in conservation. Oxford:Oxford University Press,1996:237.
- [13] SOULE M E. Conservation biology: the science of scarcity and diversity [M]. Sunderland: Sinauer Associates,1986:19-34.

酶谱染色深浅不同,说明酶的活性大小有差别。正是这种差异性构成了鲇鱼机体代谢错综复杂但杂而不乱的整体性。

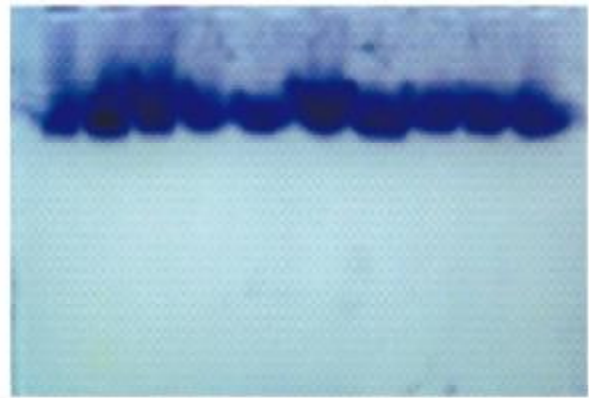
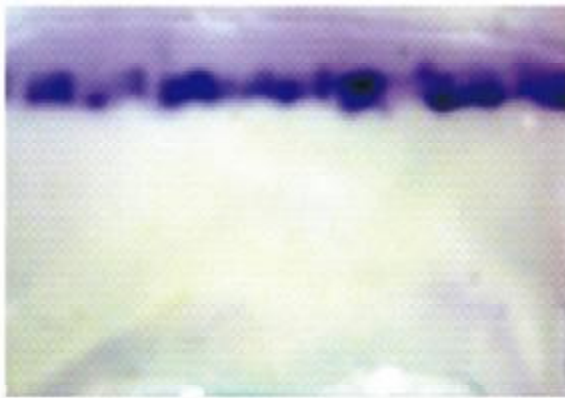


图 1 黄河鲇 9 种不同组织的电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of 9 kinds of different tissues of *Silurus lanzhouensis*

## 3 讨论

酶是基因的产物,酶的表现型可以很好地反映遗传基因的多态性情况。与外界环境关系密切的代谢调控酶的谱型越复杂,生物体在生存竞争中就越占优势。在遗传育种中,多等位基因的存在越广泛,进行人工交配的组合就越多,选育出优良品种的可能性也就越大。一个物种保持稳定的遗传变异性是其适应不同生境、生存和进化的首要保证。鱼类遗传变异性的降低可导致其适应能力降低、有害基因增加及经济性状衰退,最终导致物种退化。可以预见,保持鱼类天然种群及人工繁殖种群的遗传稳定性不仅有利于保护其遗传资源,而且对保护其天然资源也具有重要作用。从以上研究

可以看出,黄河鲇种群基因库具有广泛的遗传变异和遗传多样性,有利于黄河鲇优良鱼种的选育及其生存和物种的延续<sup>[4]</sup>。

## 参考文献

- [1] 吴旭东. 砷对鲇鱼毒作用机理和抗砷相关基因克隆及功能分析[D]. 北京:中国农业大学,2006.
- [2] 陈湘淼. 我国鲇科鱼类的总述[J]. 水生生物学集刊,1977,6(2):197-216.
- [3] 毕冰,尹洪滨,孙中武,等. 怀头鲮的同工酶[J]. 东北林业大学学报,2006,34(3):67-69.
- [4] 陈有华,闫初,赵光年. 鲇鱼不同组织同工酶的组织特异性的初步研究[J]. 氨基酸和生物资源,2006,28(2):48-50.