

应用微卫星标记分析长江流域长吻鲩 4个群体的遗传多样性

王红莹, 黄文清

(中南民族大学 生命科学学院 湖北 武汉 430074)

摘要: 为了对长江中下游长吻鲩的遗传多样性和遗传结构进行深入的分析, 同时为长江三峡大坝建成后鱼类资源保护提供有效的遗传背景资料, 选用 8 对长吻鲩微卫星引物对长江上游及长江中下游的长吻鲩 4 个群体进行遗传多样性分析。8 对长吻鲩微卫星引物在长吻鲩 4 个群体共 86 个样本中扩增出清晰稳定的条带, 且个体间表现出不同程度的多态性; 长吻鲩 4 个群体(重庆、石首、武汉、九江)的平均等位基因数分别为 7.3、5.6、4.8、3.3, 观测杂合度分别为 0.732、0.312、0.681、0.877。同时基于遗传距离所进行的聚类分析显示: 长江中下游的石首、武汉和九江群体关系较近, 而长江上游的重庆群体与中下游的 3 个群体关系较远。综合来看, 长江水系中下游长吻鲩群体的遗传多样性较贫乏。

关键词: 长江流域; 长吻鲩; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S812.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)02-0146-04

Preliminary Analysis on the Genetic Diversity in Four Populations of *Leiocassis longirostris* by Using Microsatellite Markers

WANG Hong-ying, HUANG Wen-qing

(College of Life Science, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: The research aimed to understand genetic diversity and genetic structure of *Leiocassis longirostris* and to provide effectively genetic background after the finishing of three gorges dam. Genetic diversity and genetic variation in four populations of *Leiocassis longirostris* distributed in the upper and mid-lower Yangtze River were analyzed by eight microsatellite markers. The results indicated that mean number of alleles in four populations (Chongqing, Shishou, Wuhan, Jiujiang) was 7.3, 5.6, 4.8 and 3.3 respectively. Mean observed heterozygosity (H_o) was 0.732, 0.312, 0.681 and 0.877 respectively. There was poorly genetic diversity in the four populations of *Leiocassis longirostris* distributed in Yangtze River system. The genetic distance among Shishou, Wuhan and Jiujiang was more closely than that between them and Chongqing. The genetic diversity is low in four populations of *Leiocassis longirostris* from Yangtze River.

Key words: Yangtze River; *Leiocassis longirostris*; Microsatellite; Genetic diversity

长江流域中鱼类资源非常丰富, 但由于近年来过度捕捞、水污染及大型水利工程的修建等原因, 长江渔业资源有较大衰退, 一些重要经济鱼类和一些

特有鱼类将面临生存威胁。长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)属鲶形目(Siluriformes), 鲶科(Bagrid)。俗称: 鮰鱼、江团、肥沱、灰江团鱼, 因其吻较其他鲶

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 中南民族大学自然科学基金重点项目(YZZ09001)

作者简介: 王红莹(1976-), 女, 河北保定人, 讲师, 主要从事动物学教学及科研工作。E-mail: hy_wang0806@yahoo.com.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

属鱼类长, 故称长吻鮠。它是我国长江水系中名贵经济鱼类之一, 主要分布于长江干支流和主要的通江湖泊。随着长江水环境破坏程度的加剧, 过度捕捞以及三峡大坝等水利设施的建设, 现有的野生长吻鮠资源越来越少。然而目前对于该鱼的研究主要集中于其繁殖生物学、生物学习性、养殖方法等方面, 对其遗传背景、遗传多样性现状和种质资源状况的研究相对还较少^[1-4]。

微卫星 DNA, 又称简单序列重复(SSRs)、简单序列长度多态(SSLPs), 是由 1~6 个核苷酸组成的核心序列多次串联重复而成的 DNA 序列。微卫星标记相对于其他标记具有丰富的多态性和共显性, 在染色体上分散分布、易检测、重复性好、适于自动化分析等优点, 被作为比较理想的分子标记, 在群体遗传学领域得到极为广泛的运用。

本研究利用 8 对长吻鮠微卫星引物对长江上游(重庆)和长江中下游(石首、武汉、九江)的长吻鮠进行分子群体遗传学研究, 以期了解其遗传多样性, 为评价长吻鮠的遗传多样性、遗传结构, 以及将来评估长江三峡大坝对长江鱼类生物多样性的影响提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验所用的 4 个长吻鮠群体样品分别采自:

长江上游样品采自重庆市(32 尾), 长江中下游样品来自湖北石首市(30 尾), 湖北武汉市(17 尾)和江西九江市(9 尾)。分别采集新鲜长吻鮠的尾鳍, 立刻浸泡在 95% 的酒精中, 4℃保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取 1g 的尾鳍组织于 1.5 mL Eppendorf 管中, 待乙醇挥发后用干净的手术剪刀将其充分剪碎。加入 700 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 75 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% SDS)及 10 μ L 蛋白酶 K (1 g/L), 55℃水浴充分消化 4~6 h 或消化过夜。总 DNA 的提取按照标准的酚-氯仿抽提方法进行提取, 并稀释到能进行 PCR 扩增的适量浓度^[5]。

1.2.2 PCR 扩增 选取 8 对长吻鮠引物(LL10、LL19、LL 27、LL 39、LL 45、LL 62、LL 167、LL 214)扩增相应的位点(表 1)^[6]。PCR 反应体系共 15 μ L, 包括 10 μ mol/L 的引物各 0.15 μ L, 10 mmol/L 的 dNTP 0.15 μ L, 10 \times Buffer 1.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 U, 用去离子水补充至 15 μ L。各种组分充分混合后, 进行如下反应: 94℃预变性 2 min; 94℃变性 30 s, 相应温度退火 30 s(表 1), 72℃延伸 30 s, 进行 35 个循环, 最后 72℃延伸 5 min; 4℃保存。PCR 产物采用 8% 的聚丙烯酰胺电泳进行分析。EB 染色后放入凝胶分析系统进行扫描分析, 获取凝胶电泳图谱。

表 1 试验所用引物、退火温度和等位基因大小范围

引物名称	引物序列(3'-5')	退火温度/℃	等位基因大小/bp
LL27	F: GCTCCACATACTGATGCT R: CTGACTCCCAGATACAAG	52	276~304
LL45	F: CGGCTGTCTGCTGTTATG R: GCGTTCTCGCTCGTCACT	52	167~181
LL167	F: CCTTGGCTTACCTTATTC R: CTGACAGACTCATCCTCC	54	213~229
LL19	F: CTGCTGACTGTCTGACTC R: ATGTTACCAAATCCAAG	50	224~230
LL10	F: CTTTGAACCAACCAAGAAC R: CACCAATGACTGAACGAT	56	344~366
LL214	F: GTCAATTCCGTCTTCAT R: AGCTCTGTAGTGGCATAT	54	310~344
LL62	F: TGCGTG TACTCCTCA ACT R: ACCGCTG TAAACAACACT	52	273~311
LL39	F: CTCACGCTAAGAAATCAC R: CCTAAACTCATCCCTCCT	52	299~329

1.2.3 数据统计分析 根据每个个体产生的条带的位置, 确定其基因型并估计等位基因大小。用 ARLEQUIN 3.0 软件分析微卫星位点的基因多样性指数、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e), 以及测

试微卫星位点是否偏离哈迪-温伯格平衡(HWE)^[7]。ARLEQUIN 3.0 软件计算群体间的 Nei 氏遗传距离。由 MEGA 软件包(2.1 版)依据群体间的 Nei 氏遗传距离, 按 UPGMA 法对 4 个长吻

鲩群体进行聚类分析并绘树型图。

2 结果与分析

根据每对引物扩增的等位基因大小范围,找出目的条带;根据目的条带的位置,通过同 Marker 比对估计等位基因数值。将每个个体的等位基因及等位基因数值通过 ARLEQUIN 3.0 软件处理统计分析,得出长吻鲩群体在 8 个微卫星位点的平均等位基因数、期望杂合度(He)和观测杂合度(Ho)(表 2)。

表 2 4 个长吻鲩群体在 8 个微卫星位点上的平均等位基因数、观察杂合度(Ho)和期望杂合度(He)

群体	观察杂合度(Ho)	期望杂合度(He)	平均等位基因数
重庆	0.732	0.607	7.3
石首	0.312 *	0.517	5.6
武汉	0.681	0.811	4.8
九江	0.877 *	0.372	3.3

注: *表示差异显著(P<0.05)

从表 2 可知,4 个长吻鲩群体(重庆、石首、武汉、九江)在 8 个微卫星位点上检测到的平均等位基因数分别为 7.3、5.6、4.8、3.3,长江上游(重庆)长吻鲩群体的平均等位基因数要多于长江中下游(石首、武汉、九江)的平均等位基因数,上游长吻鲩群体的基因多样性较中下游长吻鲩群体的基因多样性要高。

总体来看,长江上游和中下游长吻鲩群体的平均等位基因数都较小,最大的也只有 7.3,这些基本可以说明长江水系中长吻鲩群体的遗传变异较小,遗传多样性不丰富。

根据 4 个长吻鲩群体的 8 个微卫星位点的等位基因频率,计算出群体间的 Nei 氏遗传距离并绘出 UPGMA 分支树(图 1)。由图 1 可见,石首、武汉、九江群体之间的遗传距离较小,这说明长江中下游的这 3 个群体间的亲缘关系较近,群体遗传分化较弱;重庆群体与中下游的 3 个群体之间的遗传距离较大,其都大于中下游 3 个群体间的遗传距离,这说明长江上游群体与中下游群体间的亲缘关系较远,出现了较早的遗传结构的变化,遗传分化较大。

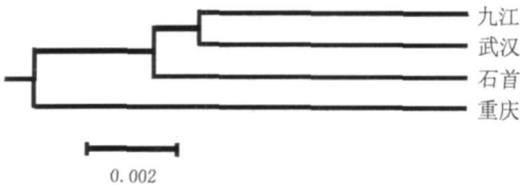


图 1 基于 Nei 氏遗传距离构建的 4 个长吻鲩群体 UPGMA 分支树

3 讨论

研究结果显示,长江上游重庆群体与中下游石首、武汉和九江 3 个群体的遗传距离显著大于长江中下游此 3 个群体间的遗传距离。此结果与 Wang 等采用线粒体标记所得结果一致^[4]。长吻鲩上游群体和中下游群体之间由于存在地理隔离从而使其产生基因交流障碍并呈现出遗传分化。而长江中下游长吻鲩群体间由于不存在明显的地理隔离,群体之间可以进行基因交流,从而导致遗传距离较小。长江长吻鲩上游和中下游群体之间虽然存在显著的遗传分化,但是同样有可能进行遗传交流。原因如下:(1)长江三峡大坝等由于具有巨大的水位落差和较快水流速度,阻止了中下游鱼类通过洄游到达上游进行繁殖,但是上游的一些个体却可能顺流而下到达中下游;(2)现在中下游长江段的野生长吻鲩资源远远低于长江上游,石首长吻鲩保护基地有时收集长江上游的长吻鲩亲鱼,然后将幼苗投到了长江中游江段,从而使得上游长吻鲩个体与中下游长吻鲩个体发生遗传交流。

长吻鲩的产卵场所主要分布在上游的沱江和中下游的荆江段^[8]。由于长江上游和中下游之间葛洲坝和三峡大坝是长江鱼类进行遗传交流的天然屏障,导致很多鱼类难于通过。但是长江中下游却是连续的区域。因此,多认为长江上游长吻鲩群体和中下游长吻鲩群体是 2 个独立的繁殖群体。本试验的结果也支持这样的观点。

群体遗传多样性是评价群体资源状况的重要的依据之一,是物种适应复杂环境、维持长期生存和进化的遗传基础。群体遗传多样性越高,表明其对多变的环境的适应能力越强,其进化的潜力也越大^[9]。本研究中长江上游(重庆)长吻鲩群体遗传多样性要高于长江中下游(石首、武汉、九江)长吻鲩群体遗传多样性。但从总体上来看,长江水系中 4 个长吻鲩群体的平均等位基因数不大,群体遗传多样性比较贫乏。尽管遗传多样性的贫乏并不一定会直接造成该物种的消亡,但从长远的角度看,遗传多样性的贫乏显然对该物种的生存和进化十分不利。采取适当的措施来保护该物种的遗传资源十分必要。因此,首先要完成对长江整个流域长吻鲩遗传生态资源的全面研究,建立相对应的保护基地;同时要科学的人工繁殖,维持长吻鲩天然群体的健康发展。

(下转第 160 页)

左旋氧氟沙星、黏杆菌素、含有酶抑制剂的 β -内酰胺类复方药物、碳青霉烯类药物最为敏感,如阿莫西林/棒酸(2:1)、头孢噻呋/他唑巴坦(2:1)、头孢曲松/他唑巴坦(2:1)、头孢噻肟/他唑巴坦(2:1)、亚胺培南、美罗培南,对头孢噻呋/磷霉素钙(2:1)、环丙沙星、强力霉素相对敏感,对阿莫西林、三代头孢类、磷霉素钙、诺氟沙星、氧氟沙星有严重的耐药性。喹诺酮类药物作为一种应用较晚的广谱抗菌药物,其耐药性也呈逐年上升的趋势,表明动物源大肠杆菌对其适应性产生速度很快,大肠杆菌的耐药谱越来越广,耐药率比 20 世纪 90 年代显著升高^[3-5]。本次试验结果与宋立等^[6]报道的家禽大肠杆菌以多重耐药为主,耐 10~19 种药物的菌株占 50%以上的结果相一致。刘晓华等^[7]也报道了吉林省部分地区鸡源大肠杆菌普遍耐药,耐药菌株大多数为多重联合耐药,11 重耐药菌株最多。因此,建议在临床上停用已普遍产生耐药性、明显无效的药品,选用目前应用较少,经药敏试验证明对大肠杆菌敏感的药品。此外,还应考虑采取联合用药、交叉或轮换用药等方法。

治疗输卵管炎要慎重选药,宜中西医结合治疗。过去养殖户一直认为输卵管炎随使用些药品就能治愈,但从以上药敏试验结果不难看出,现今引起输卵管炎的细菌一般耐药性较强,尤其久治不愈的病例,更要慎重选药。在用一些抗生素治疗不见效的情况下,应进行剖检,若输卵管伞没有发生器质性病变,则应立即换用其他更好的药品进行治疗,以免造成

更大的损失,培养更多的耐药性细菌。治疗输卵管炎时,最好结合中药进行调节机体,如本次治疗选用方剂为激蛋散加减,方中益母草、黄芪、川芎理气活血,黄连、白头翁清热解毒,地榆清大肠湿热同时止血,苍术燥湿健脾理气,山楂健脾助消化,诸药合用达到治疗与修复输卵管损伤目的。

参考文献:

- [1] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement; Standard M100-S13[S]. Pennsylvania: NCCLS, 2004.
- [2] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [3] 张宇. 喹诺酮类抗菌药的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(16): 1345-1348.
- [4] 肖方, 李新生, 张素梅, 等. 质粒介导的喹诺酮类耐药基因在鸡源大肠杆菌中的流行[J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 222-225.
- [5] 杜向党, 张素梅, 李新生, 等. 鸡致病性大肠杆菌对头孢噻呋和氟喹诺酮类药物的敏感性[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(8): 73-76.
- [6] 宋立, 宁宜宝, 张秀英, 等. 中国不同地区家禽大肠杆菌血清型分布和耐药性比较研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1466-1473.
- [7] 刘晓华, 张林波, 沙里金, 等. 吉林省部分地区鸡源大肠杆菌耐药性监测[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(3): 338-341.

(上接第 148 页)

参考文献:

- [1] 陈萍. 长吻鮠人工高产养殖技术[J]. 现代农业科技, 2009(22): 317-319.
- [2] 戴建华, 殷文莉, 杨代淑, 等. 长吻鮠肝脏线粒体 DNA 的研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1994, 49(1): 115-120.
- [3] 万全, 刘恩生, 申德林, 等. 长吻鮠染色体组型分析[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 182-184.
- [4] Wang Z, Zhou J, Ye Y, et al. Genetic structure and low-genetic diversity suggesting the necessity for conservation of the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* (Pisces: Bagridae)[J]. Environ Biol Fishes, 2006, 75: 455-463.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Xiao M, Yang G. Isolation and characterization of 17 microsatellite loci for the Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. Mol Eco Resources Note, 2009, 9: 1039.
- [7] Excoffier Laval L, Schneider S. Arlequin ver 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evol Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50.
- [8] 吴清江. 长吻鮠(*Leiocassis longirostris* Gunther)的种群生态学及其最大持续鱼获量的研究[J]. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 387-408.
- [9] Avise J C, Arnold J, Ball R M. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic[J]. Annual Rev Ecol Sys, 1987, 18: 489-522.