

鳊鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析

韩晓磊^{1,2}, 徐建荣², 李小蕊¹, 伊纪峰¹, 杨家新¹, 许璞^{1,2}

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

(2 常熟理工学院生物与食品工程系, 江苏 常熟 215500)

[摘要] 利用 AFLP 分子标记技术对长江下游苏州段野生和野生 F_1 代人工养殖的 2 个鳊鱼 (*Elopichthys bambusa*) 群体遗传多样性进行分析研究。6 对选择性引物在 2 个群体 47 个个体中, 共扩增出 313 个位点, 多态位点 47 个。鳊鱼野生和野生 F_1 代人工养殖 2 个群体的多态位点比率和 Shannon's 指数分别为 13.42%、8.31%、0.054、0.032。前者遗传多样性较后者略高。基因分化系数 G_{st} 和 Shannon's 指数分析均显示 2 个鳊鱼群体之间出现一定遗传分化。鳊鱼 UPGMA 系统树有分支出现且依据群体分别聚类, 表现出一定的遗传趋异。结果分析表明, 鳊鱼群体的遗传多样性相对贫乏; 野生 F_1 代人工养殖群体尚未形成自己独立的遗传结构, 但 2 个群体间已经产生了一定的遗传分化, 经过较多世代的人工繁育有可能形成自己独立而稳定的遗传结构。

[关键词] 鳊鱼, AFLP, 遗传多样性

[中图分类号] Q959.468 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)01-0110-05

Analysis of Genetic Diversity of *Elopichthys bambusa* by AFLP Markers

Han Xiaolei^{1,2}, Xu Jianrong², Li Xiaoru¹, Yi Jifeng¹, Yang Jiaxin¹, Xu Pu^{1,2}

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Department of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract Genetic diversity of a wild populations and a cultured population of *Elopichthys bambusa* was investigated using amplified fragment length polymorphism (AFLP). The wild population was collected from Suzhou area of Yangtze River and the cultured population was hatchery-reared offspring of wild caught individuals from the same area. Six EcoRI and MseI primer combinations produced 47 polymorphic markers out of the total of 313 bands amplified from 47 total individuals. The proportions of polymorphic loci of the wild population and the cultured population were 13.42% and 8.31%, respectively. These Shannon's information index and average heterozygosity were 0.054 and 0.032, 0.341 and 0.199, respectively. The results showed that there was a little differentiation in the genetic diversity index of these two populations. G_{st} value and Shannon's information index indicated that there was some genetic differentiation between populations. The UPGMA tree based on AFLP data supported this result. In this paper, the results of AFLP analysis indicated that two populations of *E. bambusa* presented lower genetic diversity. Moreover, some genetic differentiation were showed between two populations, and the cultured population will maybe form stable own genetic structure by multi-generation artificial breeding.

Key words *Elopichthys bambusa*, amplified fragment length polymorphism (AFLP), genetic diversity

鳊鱼 (*Elopichthys bambusa*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 雅罗鱼亚科 (Leuciscinae), 鳊属 (*Elopichthys*), 生活于水域的中上层, 主要分布于我国长江中下游的江河湖泊中, 为江河、湖泊中的大型经济鱼类之一^[1]。鳊鱼活动迅速, 性猛贪婪, 是凶猛的肉食性鱼类, 能淘汰病弱及小型鱼类, 在保持水体生态平衡中起着重要作用, 又因其肉质鲜美, 被列入大型上等食用鱼类^[2]。近年来, 随着自然环境的恶化、捕捞强度的增大, 鳊鱼资源遭到了严重的破坏, 种群数量急剧下降, 许多水域已经很难寻觅其踪

收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 江苏省科技厅 (BG2006337)、苏州市科技局 (SZG0702) 资助项目。

通讯联系人: 许璞, 研究员, 研究方向: 紫菜遗传育种。E-mail: xupu66@sina.com

影^[3],已被列入国家重点保护濒危及受威胁水生物种名录^[4].因此,充分认识鳊鱼的种群遗传结构和遗传多样性,对其种质保护、种群恢复和持续利用具有重要意义.

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术具有多态性丰富、显性表达、无复等位效应、灵敏度高、快速高效等优点,可在较短的时间内掌握大量遗传信息,在海洋生物中已被广泛应用于遗传多样性分析、遗传连锁图谱的构建及仔稚鱼鉴定等方面^[5-7].迄今,对鳊鱼的研究主要集中在生态、胚胎发育、繁殖习性和人工养殖等方面^[2,3,8-10],涉及鳊鱼遗传学方面的研究仅见于其染色体组型分析^[11].本文利用 AFLP技术对我国长江鳊鱼野生和野生 F₁代人工养殖 2个群体的遗传结构及遗传多样性进行了研究,以期对鳊鱼的种质保护与管理提供一定的科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

鳊鱼野生群体(简称 W 群体)样品于 2007年 5~10月期间捕于长江水域苏州段(N31.32 E120.62);野生 F₁代人工养殖群体(简称 F₁群体)样品于 2007年 5月取于常熟市长江水产资源驯养保护示范基地(N31.39 E120.43).取样品尾部肌肉组织于无水酒精中-20℃保存备用,W 群体和 F₁群体分别取 26尾和 21尾用于 AFLP分析.

1.2 DNA 提取

基因组 DNA 的提取参照 Sambrook 等《分子克隆试验指南》^[12].用 Amersham Biosciences Ultraspec 2100紫外分光光度计测定 DNA 浓度,并通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,置-20℃保存备用.

1.3 AFLP 分析

参照 Vos 等^[13]的方法构建 AFLP图谱,引物人工接头由上海生工合成,选择性扩增使用了 8种 EcoRI 引物和 12种 MseI 引物共 96个引物组合,接头序列、预扩增引物序列和选择性引物序列(表 1).根据预实验结果,从扩增带数目适中,多态性高的引物组合中随机选取了 E35M47, E35M59, E35M61, E38M61, E39M49, E39M61共 6组引物组合.扩增产物在 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶上进行 60W 恒功率高压电泳,电泳结果参照[12]进行银染检测.

1.4 数据分析

将电泳图谱中同一位置上 AFLP条带的有无进行统计,有条带的记为 1,无条带的记为 0 得出 0 1 原始数据矩阵.对 AFLP 数据进行分析统计的遗传学参数主要如下:

显性基因型频率 $P_d = n_i / n$ 其中: n_i 为位点 i 上有带的个体数, n 为总个体数.

多态位点比率 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$

遗传相似系数 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_{xy} 是个体 x 和个体 y 共有位点数, N_x 和 N_y 分别是个体 x 和个体 y 总位点数.

遗传距离 $D = 1 - S$ 式中 S 为相似系数.

利用 POPGEN 1.32 计算遗传相似度和遗传距离等, MEGA 3.0 软件构建 UPGMA 系统树.

2 结果

2.1 AFLP 扩增结果

所选用的 6对选择性引物,从 W 和 F₁ 2个群体共计 47尾鳊鱼的 DNA 样品中共检出了 313个不同长

表 1 AFLP 分析所用的接头、预扩增和选择性扩增引物

Table 1 Adaptor and primer sequences used in AFLP analysis

引物 Primer	序列 Sequence
接头	
Adaptors	
EcoRI 接头	5'-CTCGTACTGCGTACG-3' 5'-AATTGGTACGCACTCTAG-3'
MseI 接头	5'-TACTCAGGACTCAT-3' 5'-GACGTGAGTCTCTGAG-3'
预扩增引物	
Pre-amplification primer	
EcoRI+1	5'-GACTGCGTACCAATTG-3'
MseI+1	5'-GATGAGTCTCTGAGTAA-3'
选择性扩增引物	
Selective amplification primer	
EcoRI+3	
E35	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
E38	5'-GACTGCGTACCAATTCACCT-3'
E39	5'-GACTGCGTACCAATTCAGAA-3'
MseI+3	
M47	5'-GATGAGTCTCTGAGTAACAA-3'
M49	5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CAG-3'
M59	5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CTA-3'
M61	5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CTC-3'

度的扩增片段 (60~ 700 bp). 对 313 个位点进行统计发现, 在 2 个群体中显性基因型频率为 100% 的位点有 266 个 (84.98%), 这些位点为 2 个群体共有的 AFLP 标记. 不同引物的扩增结果间存在差异, 产生的扩增条带从 42 到 64 不等, 扩增出的多态条带范围为 4~ 12 条, 多态位点比率范围为 8.16% ~ 23.09% (表 2). 表 2 可见各引物组合的总位点数差异不显著 ($P > 0.05$). 图 1 显示了引物 E39M49 在鳊鱼群体中的扩增图谱.

表 2 不同引物的扩增结果

Table 2 Number of bands generated by primer combinations

引物组合 Primer combination	总扩增位点数 n. of total amplified loci	总多态位点数 (多态位点比率) n. of total polymorphic loci (p. of all polymorphic loci)	多态位点数 (多态位点比率) n. of polymorphic loci (p. of all polymorphic loci)	
			W	F ₁
E35M47	64	9 (14.06%)	7 (10.94%)	6 (9.38%)
E35M59	57	9 (15.79%)	7 (12.28%)	6 (10.53%)
E35M61	42	5 (11.90%)	4 (9.52%)	4 (9.52%)
E38M61	52	12 (23.09%)	12 (23.08%)	7 (13.46%)
E39M49	49	4 (8.16%)	4 (8.16%)	1 (2.04%)
E39M61	49	8 (16.33%)	8 (16.33%)	2 (4.08%)
总计 total	313	47 (15.02%)	42 (13.42%)	26 (8.31%)

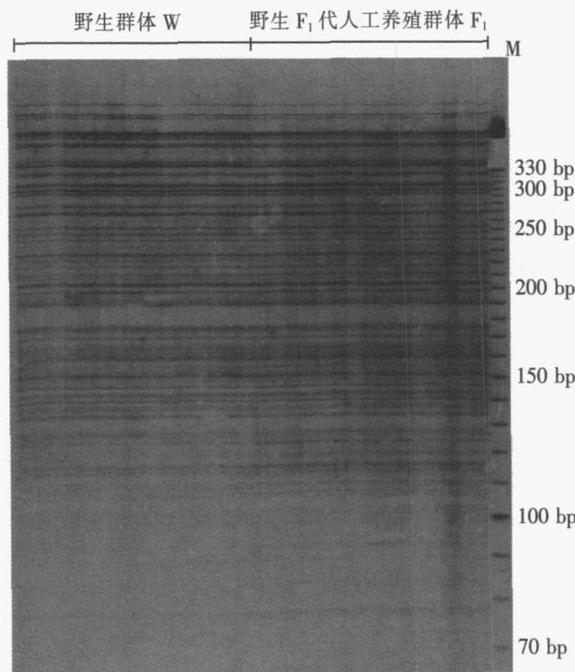


图 1 引物 E39M49 在鳊鱼群体中的扩增图谱

Fig.1 AFLP band patterns generated by primer combinations E39M49 in *Elopichthys bambusa*

2.2 群体的遗传多样性

在 313 个扩增片段中, 多态片段为 47 条, 多态位点比率为 15.02%. 在 W 和 F₁ 2 个群体中分别扩增出 42 个和 26 个位点, 平均多态位点比率分别为 13.42% 和 8.31%. W 群体的平均杂合度和 Shannon' s 指数均比 F₁ 群体略大 (表 3), 两群体间的 Shannon' s 指数为 0.0892

2.3 2 个群体内及群体间的遗传距离和遗传分化

群体内扩增位点的遗传相似度 W 群体为 0.9813, F₁ 群体为 0.9891, 前者遗传相似度低于后者; 2 群体间遗传相似度和遗传距离分别为 0.9879 和 0.0121. 由 Shannon' s 指数估算的遗传变异有 85.07% 存在于群体内个体间, 14.93% 存在于群体间; 基因分化系数 G_s 估算群体间的变异占总体变异的 13.16% (表 3).

表 3 群体内及群体间的遗传相似度、遗传距离及遗传多样性指数

Table 3 The genetic similarities within and between populations and the genetic distances and Shannon's index between the two populations

		W	F ₁	W - F ₁
遗传相似度 Genetic similarity	平均值 Average	0.981 3	0.989 1	0.983 5
	最大值 Maximum	0.995 0	0.998 3	0.998 3
	最小值 Minimum	0.967 5	0.976 5	0.967 5
	标准差 ^①	0.005 1	0.004 5	0.005 7
群体间遗传距离 ^②	/	/	0.012 1	
Shannon's 指数 Shannon's index	0.054 4	0.032 0	0.089 2	
平均杂合度 ^③	0.034 1	0.019 9	0.057 4	
基因分化系数 G _{st} ^④	/	/	0.131 6	

注: ① Standard deviation ② Genetic distance between populations ③ Average heterozygosity ④ Coefficient of gene differentiations

2.4 2个群体的遗传结构和聚类分析

将 313 个扩增位点的显性基因型频率以 10% 为单位划分区间, 0 设为一个单独的区间, 由于显性基因型频率为 100% 的位点数都在 275 (87.86%) 左右, 远大于其他区间上的位点数, 所以没有将 100% 作为一个区间, 这样划分为 11 个区间, 统计显性基因型频率位于各区间内的位点数 (图 2)。结果显示, 2 个群体的显性基因型频率分布波动较大, 但除了少数几点外其大体走势还是相一致的。利用 MEGA 3.0 软件构建了鳊鱼 47 个个体的 UPGMA 系统树 (图 3), 鳊鱼 2 个群体分别聚类, 有明显歧化。

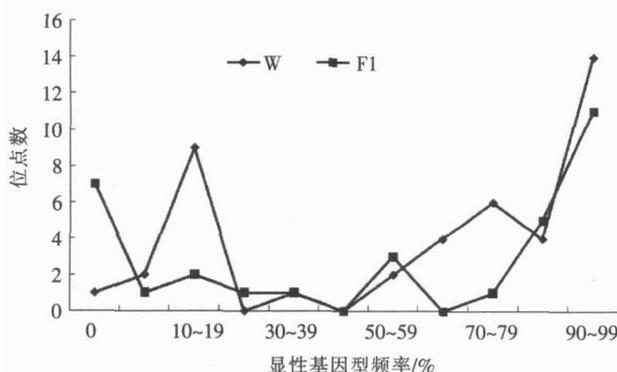


图 2 扩增位点数在不同显性基因型频率区间内的分布

Fig.2 Distributions of amplified loci in different frequency intervals

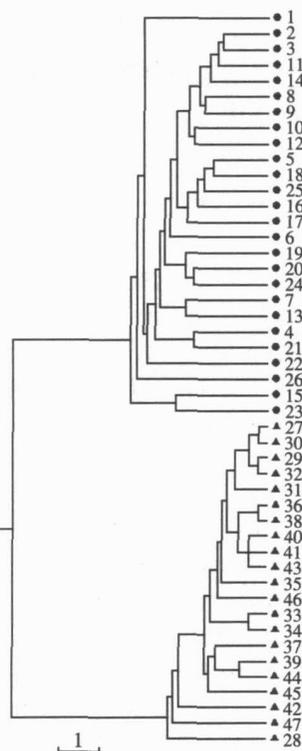


图 3 鳊鱼 57 个个体的 UPGMA 系统树(1-36: 野生 W, 37-57: 野生 F₁ 代人工养殖 F₁)

Fig.3 UPGMA dendrogram of 47 individuals of *Elopichthys bambusa*(1-26: W, 27-47: F₁)

3 讨论

3.1 遗传多样性水平

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, 它是物种适应多变的环境、维持长期生存和进化的遗传基础。一般认为, 平均多态位点比率和平均杂合度是衡量生物群体遗传多样性高低的参数^[14], 本文通过比较鳊鱼群体的扩增位点数、平均多态位点比率和平均杂合度发现, W 群体同 F₁ 群体的遗传多样性处于相同水平上, 且 W 群体要稍高于 F₁ 群体, 同其他已研究鱼类 AFLP 数据^[5, 6] 比较发现, 鳊鱼群体的遗传多样性相对贫乏。通过 Shannon's 指数分析也得出了以上结论。显性基因型频率分布显示, F₁ 群体一些位点的丢失和减少, 同样说明 F₁ 群体的遗传多样性会略低于 W 群体。

近年来,水体污染、产卵场被破坏以及捕捞量增大等因素,造成鳊鱼野生群体的数量急剧下降,繁殖群体日益减少^[4,10],且由鳊鱼 UPGMA 系统树(图 3)部分个体聚类成紧密分支可以看出鳊鱼群体发生了较强的近亲交配;加之鳊鱼个体大、性成熟晚,又处于食物链的高层,致使其种群恢复能力较差,很容易面临濒危。基于上述因素导致鳊鱼群体遗传多样性水平偏低,因此我们有必要重视对鳊鱼野生群体遗传多样性的保护。 F_1 群体(野生 F_1 代人工养殖群体)遗传基础来自于 W 群体,因而 2 个群体遗传多样性不会有明显的差异,处于同一水平上。 F_1 群体在人工繁育过程中亲本数量的限制,遗传漂变的结果会导致一些稀有位点和多态位点的丢失,低频位点数的减少,隐性纯合位点数的增加,使其遗传多样性有所降低,因此在未来的养殖过程中有必要加大选育亲本的数量并对选育群体的遗传多样性情况予以适时检测,以减少或避免人工选育和累代人工繁殖造成的近交和纯合化。

3.2 群体遗传分化分析

鳊鱼 2 个群体的遗传相似性很高,遗传距离很小,群体遗传结构相似,但 F_1 群体内个体间的遗传距离较 W 群体有所减少,说明 F_1 群体虽然没有形成自己独立而稳定的遗传结构,但已经出现了遗传分化的趋势。本文利用 G_{st} 和 Shannon's 指数 2 种方法估算鳊鱼群体内和群体间的遗传变异情况,进一步说明鳊鱼 2 个群体间出现了一定的遗传分化;鳊鱼 UPGMA 系统树有分支出现并依据群体分别聚类,也说明 2 个群体间产生了一定的遗传分化。由以上结论得出, F_1 群体经过较多世代的人工繁育可能形成趋于稳定的自己独立的遗传结构。

[参考文献]

- [1] 刘建康,何碧梧.中国淡水鱼类养殖学[M]. 3版. 北京:科学出版社,1992
- [2] 朱宁生,陈宏溪.梁子湖中鳊鱼的食性[J].水生生物学集刊,1959,3:262-271.
- [3] 段辛斌,陈大庆,刘绍平,等.长江三峡库区鱼类资源现状的研究[J].水生生物学报,2002,26(6):605-610
- [4] 李家乐,李应森,董志国,等.中国外来水生动植物[M].上海:上海科学技术出版社,2007.
- [5] 张全启,徐晓斐,齐洁,等.牙鲈野生群体与养殖群体的遗传多样性分析[J].中国海洋大学学报,2004,34(5):816-820
- [6] 张俊彬,黄良民,陈真然.AFLP技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究[J].海洋学报,2005,27(2):165-171.
- [7] Liu Y, Chen S, Li B, et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder *Paralichthys olivaceus* using AFLP markers [J]. Biochemical Systematic and Ecology, 2005, 33: 993-1005
- [8] Li K. Management and restoration of fish communities in Lake Taihu, China [J]. Fisheries Management and Ecology, 1999, 6: 71-81.
- [9] 梁轶燊,易伯鲁,余志堂.长江干流和汉江的鳊鱼繁殖习性及其胚胎发育[J].水生生物学集刊,1984,4(8):389-403
- [10] 宓国强,卢斌辉.鳊鱼池塘养殖技术初探[J].淡水渔业,2004,34(5):54-55.
- [11] 周密,康扬,李渝成,等.鲤科七种鱼的银染核型研究[J].动物学研究,1988,9(3):221-231
- [12] Sambrook J, Fritsch E F. 分子克隆试验指南[M]. 2版. 金东雁,黎孟枫,等译.北京:科学出版社,1996
- [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407.
- [14] Richards C, Lekberg P L. Temporal changes in allele frequencies and a population's history of severe bottlenecks [J]. Conserv Biology, 1996, 10: 832-839

[责任编辑:孙德泉]