

文章编号: 1000-0615(2008)03-0321-06

我国引进条斑星鲷群体遗传多样性的 AFLP 分析

马洪雨^{1,2}, 陈松林², 田永胜², 季相山²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:应用 AFLP 技术对我国条斑星鲷引进群体(烟台、大连和莱州)共 63 尾个体的遗传多样性及遗传变异进行分析, 计算了 3 个群体间的遗传相似性指数和遗传距离, 并构建了 UPGMA 系统发生树。10 个引物组合在 3 个群体中共扩增到 827 个位点, 大小位于 50~700 bp。每个引物组合扩增到的多态性条带在 8 到 37 条之间不等, 平均为 17.9 个。3 个群体的多态性位点比例分别为 29.14%、15.60% 和 20.31%; Shannon 多样性指数分别为 0.1799、0.0949 和 0.1231; Nei 基因多样性指数分别为 0.1225、0.0658 和 0.0848。3 个条斑星鲷引进群体的遗传多样性水平, 烟台引进群体最高, 莱州引进群体次之, 大连引进群体最低, 但总体水平均较低。烟台引进群体与大连引进群体间的遗传距离最大为 0.0230, 莱州引进群体与大连引进群体间的遗传距离最小为 0.0129。3 个引进群体间的遗传分化系数(*Gst*)为 0.219, 表明 3 个引进群体之间发生了一定程度的分化。

关键词:条斑星鲷; 遗传多样性; 扩增片段长度多态性; 遗传分化

中图分类号: S 917; Q 958

文献标识码: A

条斑星鲷 (*Verasper moseri*) 俗称“花豹子”, 属鲷形目 (Pleuronectiformes)、鲷科 (Pleuronectidae)、星鲷属 (*Verasper*)。主要分布于日本北海道太平洋沿岸以及鄂霍茨克海以南海域^[1], 我国黄渤海亦有分布, 但资源量极少。由于条斑星鲷含有丰富的胶原蛋白和游离氨基酸, 肉质、口感较好, 具有很高的经济价值与养殖价值, 是一个值得推广的优良品种。目前我国养殖条斑星鲷亲鱼多从日本引进。自 1975 年以来, 野生条斑星鲷的数量急剧下降, 渔业资源已处于非常严峻的形势, 目前, 条斑星鲷已经成为一个稀有物种^[2], 因此, 保种和资源恢复工作已显得尤为重要。日本栽培渔业协会厚岸事业场 (National Center for Stock Enhancement) 于 1987 年开始实施条斑星鲷种质提高计划, Ortega-Villaizan 等^[3]开发了条斑星鲷的微卫星标

记, 并利用多态标记评价了该事业场条斑星鲷苗种及其后代的遗传多样性。我国在条斑星鲷育种及养殖方面与日本相比起步较晚, 近年来, 辽宁、河北、山东等省份多次从日本引进条斑星鲷苗种进行驯化养殖, 目前在生产上还未实现人工育苗及养殖的产业化。对这些苗种及后代进行 DNA 水平上的遗传多样性及分化研究, 将对引种与育种工作具有重要的理论指导意义。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分子标记技术^[4]结合了 RFLP 的准确性和 PCR 的高效性, 具有多态性高、稳定性好、灵敏度高、显性表达、无需预先知道基因组信息等优点, 因而被广泛应用于动植物遗传多样性分析^[5-7]、遗传图谱构建^[8-10]、功能基因筛选^[11]及种质鉴定^[12]等领域。与微卫星^[13]等其它分子标记相比, AFLP 技术在海水鱼类上应用

收稿日期: 2007-06-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A403); 山东省泰山学者建设工程专项经费资助; 上海高校水产养殖学 E-研究院项目 (E030090)

作者简介: 马洪雨 (1979-), 男, 山东招远人, 博士, 主要从事海洋生物技术研究。E-mail: mhyx@163.com

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

的研究报道较少^[14-15],本文利用 AFLP 技术对我国条斑星鲽引进群体的基因组进行扫描,评价其遗传多样性水平,以期为条斑星鲽的引种和育种工作提供分子水平上的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2006年2月于大连取条斑星鲽10尾的血液,加抗凝剂于试管中带回实验室(以下简称为“DL群体”);2006年12月于莱州取条斑星鲽28尾,活体带回实验室(以下简称为“LZ群体”);2007年4月于烟台取条斑星鲽25尾个体的鳍条,置于含酒精的1.5 mL的离心管中带回实验室(以下简称为“YT群体”)。

1.2 基因组 DNA 的提取

大连引进群体的血液,莱州引进群体的肝脏和烟台引进群体的鳍条分别用于基因组 DNA 的提取。提取方法分别参考文献^[14,16-17]。用0.8%的琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪(Pharmacia Biotech Ltd.)检测基因组 DNA 的质量和浓度,并将 DNA 的浓度稀释为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存。

1.3 AFLP 分析

AFLP 分析参照 Vos 等^[4]的方法。所用试剂均来自 IRDyeTM Fluorescent AFLP Kit (LI-COR, USA),所有操作均参照试剂盒说明书。两种内切酶分别为 *EcoR* I 和 *Mse* I,预扩增引物的3'末端加1个选择性碱基,其序列分别为 *EcoR* I + A (5'-GACTGCGTACCAATTC + A 3')和 *Mse* I + C (5'-GATGAGTCCTGAGTAA + C 3')。选择性扩增引物的3'末端加3个选择性碱基,序列详见表1。

1.4 数据统计分析

根据测序胶电泳结果,选取样品间一致性较强,且条带清晰可辨的电泳图谱进行 AFLP 统计

分析。按照测序胶同一位置上 AFLP 条带的有无进行统计,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,获得原始 0、1 矩阵。扩增位点名称:由引物组合名称及其在该引物组合的所有扩增位点中的序号组成。引物组合名称与序号之间用“-”连接。每一引物组合的扩增位点按照片断从小到大的顺序依次编号。利用 POPGENE (Version 1.31) 软件^[18]统计位点总数、多态位点数和每个引物组合的多态位点比例,计算有效等位基因数、Shannon 多样性指数、Nei 基因多样性指数、遗传分化系数 (*Gst*)、遗传相似性指数和遗传距离^[19],并利用软件 PHYLIP (Version 3.5) 构建 3 个群体的 UPG-MA (unweighted pair-group mean analysis) 系统发生树。

$$Gst = (H_T - H_S) / H_T$$

其中, H_T 为总群体杂合度,即将所有群体作为一个群体; H_S 为亚群体杂合度,即各群体平均杂合度。

2 结果

2.1 3 个引进群体的 AFLP 扩增结果

选取大小位于 50~700 bp 之间的清晰可辨、可重复性的条带进行分析。10 个引物组合共扩增出 827 条带,平均为 82.7 条。每个引物组合扩增到的多态性条带在 8~37 条,烟台引进群体的多态性条带最多为 241 条,大连引进群体的多态性条带最少为 129 条。引物组合 MBE2 的多态性最高,多态性条带比例分别为 41.10%、23.29%、26.03%;引物组合 MIE6 的多态性最低,多态性条带比例分别为 19.44%、11.11%、13.89% (表 2)。

2.2 3 个引进群体的遗传多样性

对有效等位基因数的统计表明,烟台引进群体的有效等位基因数最多为 1.2117 个,莱州引

表 1 选择性扩增引物名称及序列

Tab. 1 Selective amplification primers and their sequences used in AFLP analysis

<i>EcoR</i> I 引物	<i>EcoR</i> I primers	序列 (5'-3') sequences	<i>Mse</i> I 引物	<i>Mse</i> I primers	序列 (5'-3') sequences
E2		GACTGCGTACCAATTC + AAG	M1		GATGAGTCCTGAGTAA + CAA
E3		GACTGCGTACCAATTC + ACA	M2		GATGAGTCCTGAGTAA + CAC
E4		GACTGCGTACCAATTC + ACC	M3		GATGAGTCCTGAGTAA + CAG
E5		GACTGCGTACCAATTC + ACT	M5		GATGAGTCCTGAGTAA + CTA
E6		GACTGCGTACCAATTC + ACG	M7		GATGAGTCCTGAGTAA + CTG
E7		GACTGCGTACCAATTC + AGC			
E8		GACTGCGTACCAATTC + AGG			

进群体次之为 1.1507 个,大连引进群体最少为 0.1799 和 0.1225、0.0949 和 0.0658、0.1231 和 1.1199。Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数反映的群体遗传多样性变化趋势与有效等位基因的结果一致,在 3 个群体中分别为 0.0848(表 3)。可见,烟台引进群体的遗传多样性最高,莱州引进群体次之,大连引进群体最低。

表 2 3 个条斑星鲈引进群体的 AFLP 扩增结果

Tab. 2 Summary of AFLP analysis in three introduced populations of barfin flounder

引物组合 primer combinations	烟台群体 YT population			大连群体 DL population			莱州群体 LZ population		
	N ₁	N ₂	R	N ₁	N ₂	R	N ₁	N ₂	R
M1E3	105	37	35.24%	105	21	20.00%	105	32	30.48%
M1E5	87	26	29.89%	87	12	13.79%	87	17	19.54%
M1E6	72	14	19.44%	72	8	11.11%	72	10	13.89%
M2E7	75	20	26.67%	75	10	13.33%	75	13	17.33%
M3E2	73	30	41.10%	73	17	23.29%	73	19	26.03%
M3E4	79	27	34.18%	79	12	15.19%	79	15	18.99%
M3E8	95	33	34.74%	95	12	12.63%	95	15	15.79%
M5E6	85	19	22.35%	85	13	15.29%	85	18	21.18%
M7E4	77	18	23.38%	77	12	15.58%	77	16	20.78%
M7E5	79	17	21.52%	79	12	15.19%	79	13	16.46%
总数 total number	827	241	-	827	129	-	827	168	-
平均值 mean	82.7	24.1	29.14%	82.7	12.9	15.60%	82.7	16.8	20.31%

注:“N₁”位点总数;“N₂”多态位点数;“R”多态位点比例

Notes: “N₁” total number of loci; “N₂” number of polymorphic loci; “R” polymorphism rate

表 3 3 个条斑星鲈引进群体遗传变异的 AFLP 分析结果

Tab. 3 AFLP analysis of genetic variation in three introduced populations of barfin flounder

群体 populations	有效等位基因数 effective number of alleles	Shannon 多样性指数 Shannon information index	Nei 基因多样性指数 Nei gene diversity
YT	1.2117	0.1799	0.1225
DL	1.1199	0.0949	0.0658
LZ	1.1507	0.1231	0.0848

表 4 3 个条斑星鲈引进群体间的遗传分化系数(Gst)

Tab. 4 The coefficient of gene differentiation among three introduced populations of barfin flounder

引物组合 primer combinations	总群体杂合度(H _T) population heterozygosity	亚群体杂合度(H _S) subpopulation heterozygosity	遗传分化系数(G _{st}) coefficient of gene differentiation
M1E3	0.1498	0.1200	0.1989
M1E5	0.1137	0.0878	0.2278
M1E6	0.0826	0.0549	0.3353
M2E7	0.1018	0.0753	0.2603
M3E2	0.1569	0.1224	0.2199
M3E4	0.1240	0.0929	0.2508
M3E8	0.1263	0.0844	0.3317
M5E6	0.0960	0.0819	0.1469
M7E4	0.0915	0.0819	0.1049
M7E5	0.0717	0.0688	0.0404
平均值 average	0.1114	0.0870	0.2190

2.3 3个引进群体间的遗传分化

遗传分化系数值($0 \leq G_{st} \leq 1$)越大,表明总遗传多样性主要存在于各群体之间,反之,表明总遗传多样性主要存在于各群体之内。表4列出了10个引物组合在3个引进群体中的遗传分化情况。可以看出:M1E6、M2E7、M3E4和M3E8 4个引物组合的 G_{st} 值较大,分别为0.3353、0.2603、0.2508和0.3317,表明4个引物组合在3个引进群体间的遗传分化占总群杂合度的33.53%、26.03%、25.08%和33.17%;引物组合M7E5的 G_{st} 值最小,为0.0404;3个群体的平均 G_{st} 值为0.2190,表明3个引进群体间已经发生了一定程度的分化。

利用POPGENE (Version 1.31)软件计算表明,大连引进群体与莱州引进群体间的遗传相似性指数最大(0.9872),遗传距离最小(0.0129);烟台引进群体与大连引进群体间的遗传相似性指数最小(0.9773),遗传距离最大(0.0230)。基于Nei遗传距离构建的UPGMA系统发生树表明,3个条斑星鲽群体聚成两支,其中大连引进群体与莱州引进群体聚成一支,烟台引进群体单独一支。

表5 3个条斑星鲽引进群体间的遗传相似性指数(上三角)和遗传距离(下三角)
Tab.5 Genetic similarity index(above diagonal) and genetic distance(below diagonal) among three introduced populations of barfin flounder

	YT	DL	LZ
YT	-	0.9773	0.9811
DL	0.0230	-	0.9872
LZ	0.0191	0.0129	-

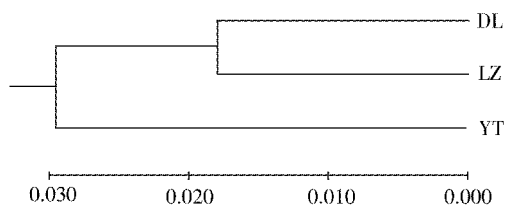


图1 基于Nei遗传距离构建的3个条斑星鲽引进群体的UPGMA系统发生树

Fig.1 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance for three introduced populations of barfin flounder

3 讨论

遗传多样性是评价物种资源状况的一个较好的指标,它是物种适应周围环境变化、维持生存和进化的遗传基础。目前,研究生物DNA水平遗传多样性的方法主要有RAPD^[20]、SSR^[21]、AFLP^[5]等。AFLP分子标记具有其它标记不可比拟的优点,特别对亲缘关系及遗传上区别不大的种类非常适用。本研究利用AFLP技术分析了我国家条斑星鲽引进群体的遗传多样性,获得了大量的清晰的稳定的条带,发现了群体间的遗传差异,表明AFLP技术适用于条斑星鲽的分子遗传学分析。

本研究中,各引物组合在不同群体中均表现出了不同的遗传多态性。10个引物组合共检测到了827条带,每个引物组合检测到的多态性条带在8到37条之间不等。烟台引进群体的多态性条带最多为241条,莱州引进群体次之为168条,大连引进群体最低为129条,多态性条带比例依次为41.10%、26.03%、23.29%。有效等位基因数表现的趋势与该结果一致。利用AFLP技术对其它鱼类的研究表明:64个引物组合在半滑舌鳎群体中共检测到4681条带,每个引物组合检测到的多态性条带在40到150条之间,多态位点比例在40%~77%之间^[14];6个引物组合在威海、厦门和北部湾海区三个野生真鲷群体中共检测出646条带,多态位点比例在58.4%~64%之间^[15];5个引物组合在福建官井洋大黄鱼野生种群和2个养殖群体中获得的多态位点比例分别为76.6%、70.6%、69.2%^[22];7个引物组合在牙鲆养殖群体中获得的总扩增位点数和多态位点比例均低于野生群体,野生群体和养殖群体的平均多态位点率分别为46.18%和40.07%^[23]。本研究中,烟台引进群体与大连、莱州引进群体相比具有较高的遗传多态性,但3个引进群体总体上遗传多态性低于以上鱼类,主要原因可能是我国引进的条斑星鲽来自养殖群体或是具有较近亲缘关系的群体,人工养殖和近亲繁殖使得遗传多样性降低。

基因多样性(h)又称为遗传杂合度,它反映了各群体在每个位点上的遗传变异。一般认为它是度量群体遗传变异的一个较适合的参数。本研究中,3个群体的平均杂合度在0.0658~

0.1225,平均为 0.1020,最高的是烟台引进群体,最低的是大连引进群体。Shannon 多样性指数的结果亦与此一致。这表明大连和莱州引进群体各自群体内的条斑星鲽可能存在一定程度的近交,从而导致某些基因趋于纯合,遗传杂合度降低。因此必须采取科学有效的育种措施保护和开发这个物种,防止优良基因的丢失,提高其对环境的适应力。

Wright^[24]认为遗传分化系数在 0.05~0.15,表示群体之间的遗传分化处于中等程度。本研究中,3 个引进群体间的遗传分化系数(*Gst*)为 0.219,引物组合 M1E6 的 *Gst* 值最大为 0.3353,M7E5 的 *Gst* 值最小为 0.0404,表明 3 个群体间发生了一定程度的遗传分化。3 个引进群体的遗传多样性水平总体不高,而群体间的遗传分化却相对较高,因此难以估计 3 个群体究竟发生了多大程度的变异。Xu 等^[25]在利用 AFLP 技术研究日本牙鲆野生群体的遗传多样性过程中,也发现了类似现象。因此,有必要进行更加深入的研究,以便更好的分析群体间的遗传变异。

根据遗传距离和 UPGMA 图可以看出,3 个群体之间的遗传相似性指数均较大,遗传距离均较小,表明 3 个引进群体之间的亲缘关系较近;烟台引进群体单独一支,而大连引进群体与莱州引进群体聚成一支,表明这两个群体在遗传上可能更为接近。在育苗育种及养殖过程中应充分考虑这些因素,以保障并促进我国条斑星鲽养殖业的健康发展。

参考文献:

- [1] Masuda H, Amaoka K, Araga C, *et al.* The fishes of the Japanese Archipelago[M]. Tokyo: Tokai University Press, 1984.
- [2] Aritaki M, Suzuki S, Watanabe K. Morphological development and growth of laboratory-reared barfin flounder *Verasper moseri* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2000,66(3): 446-453.
- [3] Ortega-Villaizan R M, Nakajima M, Taniguchi N. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the rare species barfin flounder (*Verasper moseri*) and its closely related species spotted halibut (*V. variegatus*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3: 629-631.
- [4] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
- [5] Liu Y G, Chen S L, Li B F, *et al.* Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33: 993-1005.
- [6] Mickett K, Morton C, Feng J, *et al.* Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers[J]. Aquaculture, 2003, 228: 91-105.
- [7] 韩志强,高天翔,王志勇,等. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 640-646.
- [8] Liu Z J, Karsi A, Li P, *et al.* An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. Genetics, 2003, 165: 687-694.
- [9] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, *et al.* A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220: 203-218.
- [10] Liu X D, Liu X, Guo X M, *et al.* A preliminary genetic linkage map of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8: 386-397.
- [11] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, *et al.* DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish[J]. Nature, 2002, 417: 559-563.
- [12] Congiu L, Dupanloup I, Patarnello T, *et al.* Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon[J]. Mol Ecol, 2000, 10: 2355-2359.
- [13] Chen S L, Ma H Y, Jiang Y, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from an EST library of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross-species amplification [J]. Molecular Ecology Notes, 2007,7(5):848-850.
- [14] Chen S L, Li J, Deng S P, *et al.* Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth

- tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2007, 9(2): 273–280.
- [15] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 利用 AFLP 指纹技术研究中国沿海真鲷群体的遗传变异和趋异 [J]. *水产学报*, 2001, 25(4): 289–293.
- [16] Kovacs B, Egedi S, Bartfai R, *et al.* Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Genetica*, 2001, 110: 267–276.
- [17] 马洪雨, 姜运良, 岳永生. 一种从鱼类肌肉组织中提取基因组 DNA 的简易方法 [J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(5): 531–532.
- [18] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE, version 1.31; Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis [Z]. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>. Canada, Alberta: University of Alberta and the Centre for International Forestry Research, 1999.
- [19] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583–590.
- [20] Salhi-Hannachi A, Chatti K, Saddoud O, *et al.* Genetic diversity of different Tunisian fig (*Ficus carica* L.) collections revealed by RAPD fingerprints [J]. *Hereditas*, 2006, 143: 15–22.
- [21] 马洪雨, 岳永生, 于燕, 等. 鲤微卫星引物对麦穗鱼的适用性初步研究 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(2): 278–281.
- [22] 王志勇, 王艺磊, 林利民, 等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究 [J]. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 198–202.
- [23] 张全启, 徐晓斐, 齐杰, 等. 牙鲆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.
- [24] Wright S. The genetical structure of populations [J]. *Annals of Eugenics*, 1951, 15: 323–334.
- [25] Xu X F, Zhang Q Q, Wang Z G, *et al.* Assessing genetic diversity of wild populations of Japanese flounder using AFLP markers [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 25(3): 82–89.

Genetic diversity of introduced barfin flounder (*Verasper moseri*) populations by AFLP analysis

MA Hong-yu^{1,2}, CHEN Song-lin², TIAN Yong-sheng², JI Xiang-shan²

(1. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technology was used to evaluate the genetic diversity of three introduced populations (Yantai, Dalian and Laizhou) of introduced barfin flounder (*Verasper moseri*). The genetic distance and identity index were calculated, and according to them, the UPGMA dendrogram was constructed. A total of 827 loci ranged from 50–700 bp were detected using 10 primer combinations, and 8–37 polymorphic loci were detected per primer combination. The percentage of polymorphic loci of three introduced populations of barfin flounder were 29.14%, 15.60% and 20.31%, respectively. The Shannon's information index were 0.1799, 0.0949 and 0.1231, respectively, and the Nei gene diversity were 0.1225, 0.0658 and 0.0848, respectively. The total genetic diversity level of three introduced populations was low, of which YT introduced population was the highest, LZ introduced population was lower, and DL introduced population was the lowest. The genetic distance between YT introduced population and DL introduced population was the highest (0.0230), whereas, the genetic distance between LZ introduced population and DL introduced population was the lowest (0.0129). The coefficient of gene differentiation (*Gst*) value was 0.219, showing a certain extent of differentiation among three introduced populations of barfin flounder.

Key words: *Verasper moseri*; genetic diversity; AFLP; genetic differentiation