

文章编号:1000 - 0615(2001)04 - 0289 - 06

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

王志勇¹, 王艺磊¹, 林利民¹, 洪惠馨¹, 张雅芝¹, 邱淑贞², 本信明²

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 东京水产大学资源育成学科, 日本 东京 108 - 8477)

摘要:用 AFLP 指纹技术对中国沿海真鲷群体进行遗传变异和趋异分析, 使用了 6 对引物: E - ACC/M - CAT、E - AGG/M - CTG、E - AGG/M - CTT、E - AAC/M - CTA、E - ACA/M - CTG、E - AAC/M - CAA, 在威海、厦门和北部湾海区三个野生群体共 42 个个体中检出了 646 个扩增位点(片段大小 50 ~ 400bp), 其中 70 % 位点在群体内或群体间呈现多态。三个群体的多态位点比例变化在 58.4 % ~ 64.0 %, 遗传相似系数变化在 0.8425 ~ 0.8200, 以威海群体的遗传变异量最大, 北部湾群体的最小。三群体间遗传距离和 UPGMA 谱系图显示, 厦门海区与北部湾的真鲷差异较小, 可以认为是同一个亚种群的不同群体, 黄海真鲷与前二个群体差异比较大, 属于另一个不同的亚种群。

关键词:真鲷; 群体; 扩增片段长度多态性指纹; 遗传变异与趋异

中图分类号: S917; Q3 - 3 **文献标识码:** A

Genetic variation and divergence of *Pagrus major* from China seas using AFLP fingerprinting

WANG Zhi-yong¹, WANG Yi-lei¹, LIN Li-min¹, HONG Hui-xin¹,
ZHANG Ya-zhi¹, KHOO Sock Kean², OKAMOTO Nobuaki²

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China;

2. Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4 - 5 - 7, Minato Ku, Tokyo 108 - 8477, Japan)

Abstract: AFLP fingerprinting was used to detect genetic variation and divergence of three wild stocks of Red Sea Bream, *Pagrus major*, from the Yellow Sea (Weihai), the East China Sea (Xiamen) and the South China Sea (Beibuwan). A total of 42 individuals were studied using six primer pairs (E - ACC/M - CAT, E - AGG/M - CTG, E - AGG/M - CTT, E - AAC/M - CTA, E - ACA/M - CTG and E - AAC/M - CAA). 452 (70.0 %) of 646 selectively amplified fragments ranging in size from 50 bp to 400 bp were polymorphic. The mean percentages of polymorphic bands of the three geographic stocks in question varied from 58.4 % to 64.0 %, and the genetic similarities estimated within stocks varied from 0.8425 to 0.8200. The maximum and the minimum polymorphism occurred in the samples from the Yellow Sea population and the South China Sea population, respectively. The genetic distances between stocks and UPGMA dendrogram indicated that the genetic divergence between the East China Sea stocks and the South China Sea stocks of *P. major* was small, suggesting that they

收稿日期:2000-11-16

基金项目:农业部九五渔业规划重点项目(渔 95 - A - 96 - 01 - 02)。

第一作者:王志勇(1963 -),男,福建安溪人,副教授,硕士。从事水产生物遗传育种与生物技术研究。Tel: 0592 - 6180204, E-mail: zzywang @jmu.edu.cn

belong to the same subpopulation, and the Yellow Sea stocks was separated from the other two stocks, belonging to a different subpopulation.

Key words: *Pagrus major*; population; Amplified Fragments Length Polymorphism fingerprinting (AFLP); genetic variation and divergence.

近年来,限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、随机扩增多态DNA(Randomly Amplified Polymorphism DNA, RAPD)等多种DNA分析方法相继被应用到水产生物群体遗传结构和遗传多态性的研究中。这些方法各有其优缺点,例如:RFLP法结果稳定,但操作繁杂,不适合于处理大量标本;RAPD法操作简便,但结果再现性较差,易受PCR反应条件影响等^[1]。扩增片段长度多态性(Amplified Fragments Length Polymorphism, AFLP)指纹技术是近几年来新发展起来的DNA分子遗传标记技术,它兼有RFLP法的可重复性和RAPD法的简便性,已被广泛运用于植物和动物、包括鱼类的基因组分析、有用基因定位克隆、生物种系及个体鉴别等研究^[2-7]。但国内应用该技术于水产生物研究的报道还很少^[8]。

真鲷(*Pagrus major*)体色艳丽,肉味鲜美,是一种名贵的海洋经济鱼类,也是我国海水鱼类养殖的重要对象,在我国各海区都有分布。我国已经对真鲷的基础生物学和人工繁、养殖技术进行了大量研究,实现了批量鱼苗生产,在养殖生产中还时常进行异地苗种调运;但是迄今仅见张雅芝等^[9,10]报道了台湾海峡真鲷种群的形态特性及其鉴别;还没有见到对不同海区真鲷群体的遗传多态性情况和遗传差异进行研究的报道。本文报道用AFLP指纹技术,对采自威海、厦门和北部湾海区三个群体真鲷样本的遗传变异与分化进行研究的结果。

1 材料和方法

1.1 试验材料的来源

真鲷标本1999年3月-6月采自广西北海、福建厦门和山东威海海区的野生群体,大小10~15cm,鱼自海区捕起后,即剪下尾鳍固定于95%的酒精中,送到日本东京水产大学进行实验。每个群体取14尾鱼的DNA用于AFLP分析。

1.2 基因组DNA的提取与AFLP指纹图谱的构建

用蛋白酶K+苯酚/氯仿法从固定在酒精中的鱼鳍提取基因组DNA,用GIBCO BRL的AFLP分析试剂盒(AFLP™ Analysis system)构建AFLP指纹图谱,操作方法与反应液的组成参见作者已有的报道^[7]。

1.3 数据处理

分别以1和0代表每个个体在某一迁移率处有或无扩增片段(谱带)出现,将上述获得的AFLP指纹图谱转换成为1和0构成的数字矩阵,在Microsoft Excel中用我们以Visual Basic语言编制的程序,计算各个群体中出现的所有迁移率不同的扩增片段数目、多态性片段(谱带)数目及其比例、群体内和群体间扩增片段的相似系数、群体间的遗传距离等各项参数,并对每个个体的扩增图谱一一进行比较(包括群体内与群体间),计算出基因型(即一个个体扩增谱带的组合型式)数。其中,相似系数和遗传距离的计算依照Lynch的公式^[11],谱系图以类平均聚类方法(UPGMA)构建。

2 结果

2.1 AFLP指纹分析

本研究共使用了6对选择性扩增引物,在采自威海、厦门和北部湾海区三个群体计42尾真鲷的DNA样品中,检出了646个不同的扩增片段(最大片段约为400bp,小于50bp的片段因为不清晰不计算

在内),其中 194 个片段(30.0%)为三个群体的全部个体共有,其余 452 个(70.0%)仅见于部分群体或个体,表现多态现象。将每个扩增片段视为一个基因位点,每对引物检出的位点数从 59~132 个不等,平均 107.7 个,多态位点比例占 65.5%~78.0%,以 E-AAC/M-CAA 检出位点数最多,E-AAC/M-CTA 检出位点数最少,但多态位点比例最高(表 1)。各对引物扩增检出的基因型(一个个体扩增谱带的组合型式)数目都与使用的标本数目相一致,未发现任何两个个体的基因型完全相同的现象(表 1)。三个群体之间也未发现存在稳定的、可以简单地借以进行群体鉴别的标记谱带。图版显示了 2 对引物扩增出的 AFLP 指纹样式。

表 1 选择性扩增引物及其从真鲷基因组 DNA 中检出的片段数、基因型数

Tab.1 Primer sets used and numbers of amplified bands and genotypes observed from AFLP analysis of *P. major*

引物	样本数	检出位点	多态位点 N(%)	基因型数
E-ACC/M-CAT	42	111	80(72.1)	42
E-AAC/M-CAA	42	130	89(68.5)	42
E-AGG/M-CTG	42	113	74(65.5)	42
E-AGG/M-CTT	42	132	93(70.5)	42
E-ACA/M-CTG	42	101	70(69.3)	42
E-AAC/M-CTA	42	59	46(78)	42
总 数	42	646	452(70)	252

2.2 多态位点比例与群体内的遗传相似系数

上述 6 对引物在三个群体内检出的位点数分别为 592 个(威海群体)、574 个(厦门群体)和 565 个(北部湾群体),其中多态位点数目及其比例分别为 379 个(64.0%)、346 个(60.3%)和 330 个(58.4%),以威海群体多态位点比例最高,北部湾群体最低。群体内个体间扩增位点的相似系数则以北部湾群体最高,为 0.8445,厦门群体其次,为 0.8393,威海群体最低,为 0.8223;表明威海海区真鲷群体的遗传变异最为丰富,而北部湾的真鲷群体遗传变异相对最为贫乏。但是三个海区真鲷群体的遗传变异量差异不是太大,参见表 2。

表 2 6 对选择性扩增引物在真鲷三个地方群体内检出的扩增片段总数、多态性片段比例和相似系数

Tab.2 Numbers of bands, percentages of polymorphic bands, and similarity estimates within stocks observed in 3 stocks of *P. major*

标本来源	检出位点	单态/多态位点	多态位点比例(%)	相似系数*
威海海区	592	213 / 379	64.0	0.8223 ± 0.0125
厦门海区	574	228 / 346	60.3	0.8393 ± 0.0124
北部湾	565	235 / 330	58.4	0.8445 ± 0.0131

注: *表示综合 6 对引物检出的全部位点,将全部数据合并成一个数字矩阵直接进行计算的结果。每对引物的数据分别计算后再取平均值其结果则为:威海群体 0.8220 ± 0.0172;厦门群体 0.8380 ± 0.0172;北部湾群体 0.8425 ± 0.0150。

2.3 群体间的相似系数和遗传距离

表 3 列出了按 Lynch 的方法校正后的三个群体之间的相似系数(S_{ij}),以及群体间遗传距离(D_{ij})的计算值;两者都是将 6 对引物检出的全部位点数据合并成一个总的数字矩阵直接进行计算的结果。从表中可见北部湾真鲷与厦门真鲷的遗传相似度较高(0.9950)、遗传距离较小(0.0060),与威海真鲷的遗传距离则显著较大(0.0118);厦门真鲷与威海真鲷的遗传距离也比较大

表 3 真鲷三个地方群体 AFLP 扩增位点的相似系数与遗传距离

Tab.3 Pairwise comparisons of similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between stocks estimate by AFLP-FPs for 3 stocks of *P. major*

群 体	威海群体	厦门群体	北部湾群体
威海群体	-	0.9902	0.9924
厦门群体	0.0091	-	0.9950
北部湾群体	0.0118	0.0060	-

注:对角线以上的数据为相似系数,对角线以下的数据为遗传距离。表中相似系数按下式进行校正: $S_{ij} = 1 + S_{ij}' - 0.5 \times (S_i + S_j)$ 式中 S_i 和 S_j 分别为群体 i 和 j 的相似系数, S_{ij}' 为群体 i 和 j 之间的相似系数。

(0.0091)。根据表 3 遗传距离的数据,以 UPGMA 方法构建的三个群体的谱系图如图 1。

3 讨论

真鲷广泛分布于太平洋西海岸与大洋洲各国沿海。Taniguchi 和 Sugama 曾用同工酶电泳技术研究日本沿海水域和中国东海真鲷群体的生化结构与遗传变异,认为日本沿海(包括西海岸和东海岸)的真鲷没有明显的遗传差异,应视为属于相同的地方种群(stock),而中国东海的真鲷应视为与之不同的地方种群^[12]。Perez-Enriquez 和 Taniguchi 利用微卫星 DNA 标记研究了西太平洋 8 个不同海域真鲷群体的遗传差异,认为澳大利亚、新西兰与中国至日本沿海的真鲷分属三个不同种群(population),日本与中国沿海的真鲷属于同一个种群,可区分为三个差异较大的亚种群(subpopulation),其中中国东海(浙江海域)与南海(广东海域)的真鲷分别属于不同的亚种群;而中国东海和黄海与日本沿海(高知海域除外)的真鲷则同属于一个亚种群,遗传差异不显著。高知真鲷的遗传结构明显不同于附近其它海区,是由于受到人工放流的影响^[13]。

本研究三个采样海区分别位于黄海、东海南端和南海,从研究结果来看,威海群体与北部湾群体的遗传差异显著较大,遗传距离达 0.0118,而且前者属春季生殖,后者为秋冬季生殖^[9],两者明显属于相互独立的不同的地方种群(或称亚种群 subpopulation),这与 Perez-Enriquez 和 Taniguchi^[13]的报道相一致;厦门群体与威海群体的遗传距离为 0.0091,而与北部湾群体的遗传距离为 0.0060,在聚类分析中与后者首先聚合、并且两者同属于秋冬季生殖类型,按照文献[13]的划分,厦门真鲷应视为与北部湾真鲷属于同一个亚种群,而与威海真鲷属于不同亚种群。据调查,福建与广东沿海的真鲷一般只在繁殖与育肥索饵时分别向深海与近岸作近于东西向的洄游,而很少作南北向的洄游。鉴于北部湾与厦门海区相隔甚远,其间有雷州半岛和海南岛等地理阻隔,还有大亚湾、川山群岛等多个产卵场分布,又没有强劲的海流可使两地的鱼群发生被动混杂。因此,可以认为厦门海区的真鲷群体与北部湾群体是互相独立的群体,没有直接的基因交流发生;即两者是同一亚种群中的二个不同群体(stock)。

另一方面,厦门群体与威海群体的遗传距离小于北部湾群体与威海群体的遗传距离,表现为居间类型;我们在对同样三个群体真鲷的酯酶等三种酶 11 个同工酶位点的分析中也看到了同样的现象,与厦门海区在地理上位于北部湾与黄海之间、而与北部湾距离较近恰相对应。这表明真鲷群体的遗传结构属于沿岸型结构,同一个种群或亚种群的不同群体的起源有可能追溯到一个相同的原始群体,以后由于地理上的阻隔使分布至不同海区的群体之间产生不同程度的生殖上的分隔,又由于突变和自然选择等原因,致使不同海区的群体之间产生了一定的遗传差异;但是,由于鱼本身的游动和海流(如黑潮、对马暖流等)的作用,相邻群体之间存在着一定程度的基因交流,因此地理上相近的群体之间遗传上也较为接近。Okada 曾报道观察到标志的真鲷从黄海迁移/洄游到日本南部、中国东海^[14]。中国东海、黄海与日本沿海真鲷在遗传上相似度较高即被认为与此有关^[13]。

张雅芝等^[10]曾报道台湾海峡南、北部真鲷形态特征具有显著差异,分别属于不同的群体(stock)。由于台湾海峡北部(牛山以北)真鲷属春季生殖,南部真鲷为秋冬季生殖,两者之间直接发生基因交流的可能性似乎很小。但是生产上已经证明,通过改变养殖环境、主要是水温,可以改变真鲷的繁殖季节,使两种生态型的真鲷在反季节进行繁殖、或者一年两次繁殖。这意味着,两种生态型真鲷繁殖季节的差

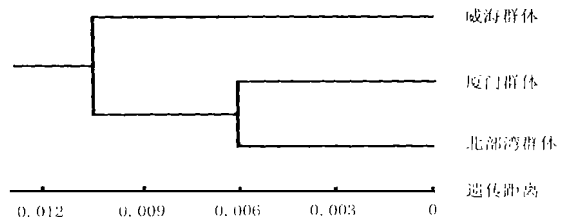


图 1 根据 AFLP 指纹分析获得的遗传距离,用类平均聚类方法构建的三个群体真鲷的谱系关系图
Fig. 1 UPGMA dendrogram showing the relationships among three geographically different populations of *P. major*, generated according to the distance matrix in Tab. 3

王志勇,王艺磊,林利民,等. 中国沿海真鲷群体遗传多态性的等位酶电泳分析. 2001.

异,主要是由于环境条件引起。春季生殖的北部海区真鲷进入到南部海区,经过适应也可能改变为在秋冬季生殖,反之亦然。由于台湾海峡南北部真鲷产卵场相距并不太远,真鲷本身还有较强的洄游习性,加上流经海峡的海流(黑潮暖流、沿岸流)的影响,台湾海峡南、北部真鲷群体之间发生有限的基因交流并非绝不可能。

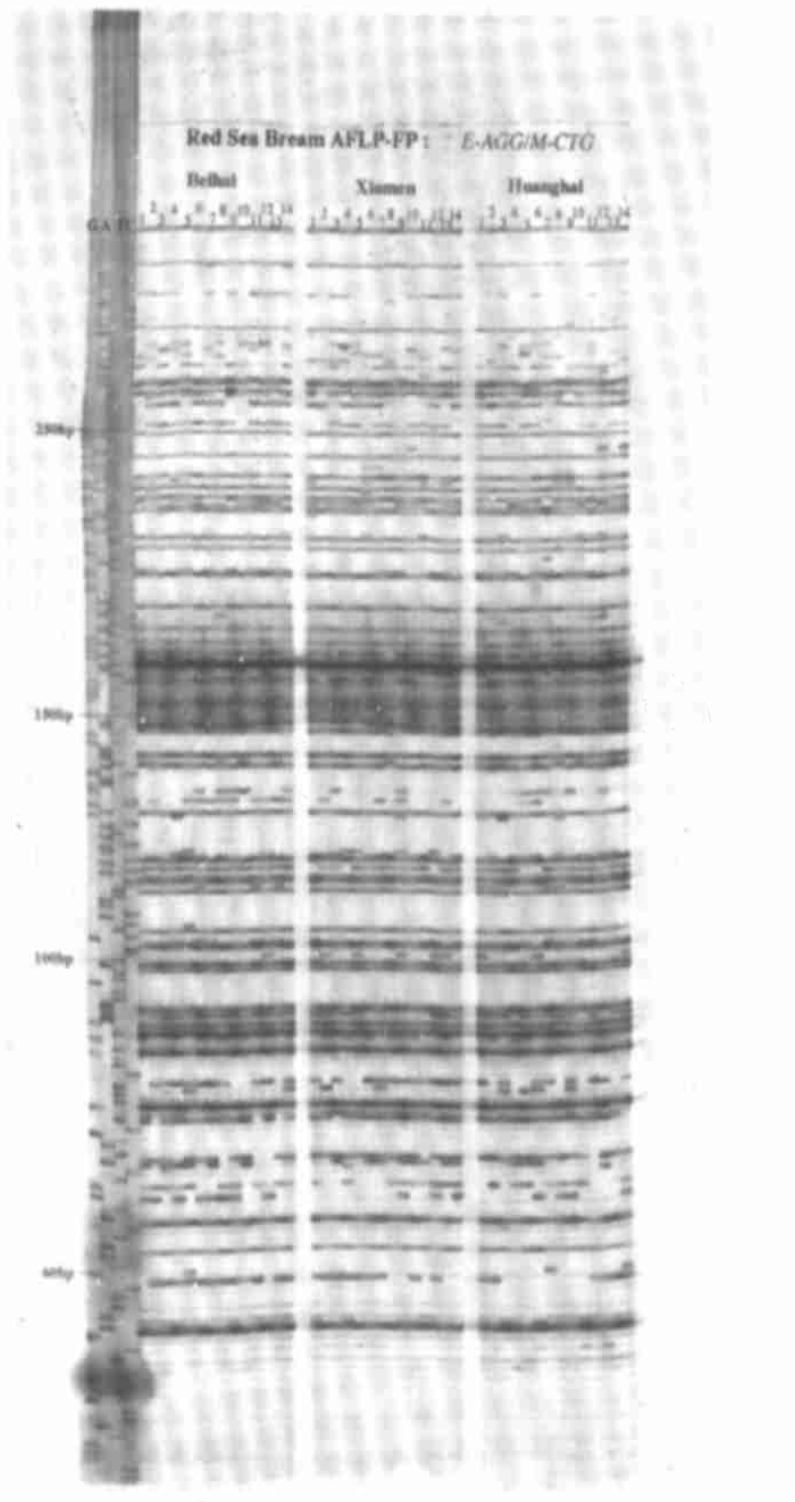
对于厦门海区真鲷标本与威海的标本遗传相似度比北部湾真鲷与威海标本的遗传相似度高,另一个可能的解释是由于人工繁养殖使得南北方的真鲷在厦门海区发生了混杂。厦门地区养殖真鲷已经有十多年历史,从广西购买真鲷鱼苗或者从青岛等地购买亲鱼进行人工繁殖、育苗,并用于在本地海区进行养殖,几乎每年都在进行。在人工养殖过程中,发生部分鱼苗逃逸入自然海区、或者成熟个体的精卵排放到海区是不可避免的;育苗场也有将卖不掉或不理想的鱼苗排放入海区的现象。由于生活环境改变,那些进入厦门海区的外来真鲷,包括来自北方的春季繁殖群体的后裔,有可能与本地群体同时成熟、繁殖,并与本地真鲷发生杂交,从而导致本地真鲷群体产生种质混杂。由此,从种质资源保护的角度出发,应该尽可能避免异地苗种调运,至少应尽可能防止外来的个体流入本地的自然水域;将来如果进行真鲷人工放流,用于放流的鱼苗以及用于繁殖人工放流鱼苗的亲鱼,绝对不可从外地海区调运。

AFLP 技术中多态性扩增片段比例与遗传多样性(即:1 - 相似系数)可以说明群体的遗传多态性情况^[6,7]。本研究的结果显示,三个取样群体中,北部湾群体的遗传变异量最低,厦门群体其次,威海群体最高(表 1、表 2)。自七十年代以后,由于捕捞过度,各地真鲷资源量都显著下降,这必然导致参与繁殖后代的亲本数量减少和遗传多态性的丧失。例如南海区大亚湾真鲷资源遭受破坏的情况就相当严重^[15];厦门海区(五通渔场)由于军事上的原因,真鲷得以维持一定的资源量^[16];黄渤海真鲷的产卵场比较集中^[10],估计该海区产卵场因此拥有较多的繁育亲体,从而保持有较大的遗传变异量。为了有效地保护鱼类的遗传资源,有必要运用多种研究手段,包括 AFLP 和微卫星 DNA 标记技术等,对各个群体的遗传变异情况进行深入地研究与跟踪监测,为制订合理的资源保护措施提供可靠的理论依据。

本研究承蒙黄海水产研究所陈超副研究员协助采集黄海区的真鲷标本,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 谷口顺彦,高木基裕. DNA 多型と鱼类集团多样性解析[A]. 鱼类のDNA[M]. 东京:恒星社厚生阁,1997,117 - 137.
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4407 - 4414.
- [3] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. Molecular Breeding, 1996, 2: 255 - 238.
- [4] Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting[J]. Tree, 1999, 14 (10): 389 - 394.
- [5] Lerceteau E, Szmidt A E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L[J]. Heredity, 1999, 82: 252 - 260.
- [6] 高木基裕,曾我部五郎,谷口顺彦. AFLP フィンガプリント法によるアユの遺伝変異保有量と分化[J]. 水产育种, 1998, 26: 55 - 21.
- [7] Wang Z, Jayasankar P, Khoo S K, et al. AFLP fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia[J]. Asian Fish Sci, 2000, 13, 139 - 147.
- [8] 邱涛,陆仁后,项超美,等. 4 种沼虾的 SRFA 指纹研究[J]. 中国水产科学, 1999, 3(1): 1 - 4.
- [9] 张雅芝,郑金宝,陈昌生,等. 秋冬季生殖真鲷仔、稚、幼鱼摄食习性与生长的研究[J]. 厦门水产学院学报, 1994, 16(2): 16 - 27.
- [10] 张雅芝,马平,杨圣云. 台湾海峡真鲷种群鉴别研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 340 - 344.
- [11] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478 - 484.
- [12] Taniguchi N, Sugama K. Genetic variation and population structure of red sea bream in the coastal waters of Japan and the East China Sea[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1990, 56 (7): 1067 - 1077.
- [13] Perez-Enriquez R, Taniguchi N. Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population of Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA markers[J]. Fish Sci, 1999, 65 (1): 23 - 30.
- [14] Okada K. Studies on the fishery biology of the sea bream in the East China and Yellow Seas. V. Distribution and movement in the Yellow Sea as Ascertained by tagging during 1965[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1968, 34, 1088 - 1097.
- [15] 杨海远. 大亚湾真鲷资源亟待保护[J]. 水产科技, 1990, 6: 7 - 8.
- [16] 陈小钢,丁永哲. 福建真鲷渔业现状及其开发利用意见[J]. 福建水产, 1988, (4): 26 - 30.



Beihai = 北部湾(北海海区); Xiamen = 厦门海区; Huanghai = 黄海(威海海区)