

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)野生与养殖群体遗传多样性的比较研究*

黎中宝 雷光高 常建波 赵斌丽 陈锦 张桂玲 王展林

(集美大学水产学院 厦门 361021; 集美大学水产生物技术研究所 厦门 361021)

摘要 采用扩增片段长度多态性技术(AFLP 技术)对 2 个野生和 2 个养殖的半滑舌鳎群体进行了遗传多样性的比较研究。实验采用 8 对 AFLP 引物组合,在四个群体的 120 个个体中共扩增出 498 个位点。结果表明,半滑舌鳎养殖群体的遗传多样性降低:河北唐山野生群体和江苏连云港野生群体的多态位点百分数分别为 45.18%和 39.96%, Nei 遗传多样性指数分别为 0.1159 和 0.1059, Shannon 多样性指数分别为 0.1817 和 0.1663, 平均有效等位基因数分别为 1.1884 和 1.1704; 山东海阳养殖群体和福建漳州养殖群体的多态位点百分数分别为 37.95%和 37.75%, Nei 遗传多样性指数分别为 0.1046 和 0.1015, Shannon 多样性指数分别为 0.1629 和 0.1587, 平均有效等位基因数分别为 1.1696 和 1.1635。半滑舌鳎群体间遗传距离为 0.0648—0.0820, 平均为 0.0725。

关键词 半滑舌鳎, AFLP, 群体, 遗传多样性

中图分类号 Q75

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)隶属舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*),是东北亚大型名贵经济鱼类,但是为了追求经济利益而进行的过度捕捞以及自然环境污染等因素,使得半滑舌鳎的自然资源量急剧减少。为了保护舌鳎的资源,研究人员已经在半滑舌鳎人工育苗技术(姜言伟等, 1993)和养殖技术应用于生产上(柳学周等, 2005)取得了突破性进展。然而不合理的人工育苗和养殖又造成半滑舌鳎近交加剧,种质资源遭受污染,致使半滑舌鳎的遗传多样性已产生很大的变化。另外,学者已经在半滑舌鳎的形态学(倪海儿等, 2002)、生理生化(柳学周等, 2006)等方面进行了相关研究,但关于半滑舌鳎野生和养殖的群体遗传多样性的比较研究并不多见。扩增片段长度多态性技术(AFLP)具有灵敏度高、信息量大、结果稳定可靠等优点,在大黄鱼(黎中宝等, 2009)、牙鲆(张全启等, 2004)、紫红笛鲷(张俊彬等,

2004)、黄姑鱼(韩志强等, 2006)等遗传多样性研究中有着广泛的应用。因此,本文采用 AFLP 技术对 2 个野生和 2 个养殖的半滑舌鳎群体进行了遗传多样性的比较研究,以期对半滑舌鳎种质资源的保护及遗传育种提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 4 个半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)群体,河北唐山(TS)野生群体取于 2006 年 10 月,共 30 尾,体长 11.8—14.8cm; 山东烟台海阳(HY)养殖群体取于 2006 年 10 月,共 30 尾,体长 10.6—17.1cm; 江苏连云港(JS)野生群体取于 2006 年 11 月,共 30 尾,体长 13.2—20.2cm。福建漳州(ZZ)养殖群体(苗种购于山东烟台招远)取于 2006 年 11 月,共 30 尾,体长 9.1—27.5cm。所有样品均为活体,充氧加冰运送至实

* 福建省科技重点项目“半滑舌鳎南方产业化人工育苗技术开发及养殖示范”,2008N0039 号;福建省海洋与渔业局“名特新海水鱼人工繁育和健康养殖规模化开发技术研究”,200805150006 号;集美大学创新团队基金,2010A004 号;福建省高等教育新世纪优秀人才支持计划,闽教科(2006)35 号。黎中宝,博士,教授, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn

通讯作者: 常建波, 研究员, E-mail: changjianbo@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-06-28, 收修改稿日期: 2010-08-23

实验室, 存于-40 冰箱保存。

1.2 实验方法

采用传统的酚/氯仿抽提法, 将每个个体的背部肌肉 50—100mg, 放入离心管, 剪碎。加入 600 μ l STE (10mmol/L Tris.Cl, pH 8.0; 0.1mol/L EDTA, pH 8.0; 1% W/V SDS)及蛋白酶 K (20 μ g/ μ l) 15 μ l, 55 $^{\circ}$ C 消化过夜。然后分别用等体积的平衡酚、酚 氯仿(1 1)、苯酚 氯仿 异戊醇(25 24 1)各抽提 2 次, 加入 2 倍体积预冷乙醇沉淀, 75%的乙醇清洗 2 遍, 适量 DDW 溶解。获得的 DNA 样品以 *Hind* 酶切的 DNA 为标准, 进行琼脂糖电泳, 紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。AFLP 方法参照 Vos 等 (1995)和黎中宝等(2009)构建 AFLP 图谱的方法。实验选用 8 对选择性引物(表 1)。

表 1 AFLP 引物序列
Tab.1 AFLP primer sequences

引物	序列
<i>Eco</i> R I 接头	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Mse</i> I 接头	5'-GACGTGAGTCTCTGAG-3' 5'-TACTCAGGACTCAT-3'
预扩增引物	
<i>Eco</i> R I	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>Mse</i> I	5'-GATGAGTCTCTGAGTAA-3'
选择性引物	
E-AAC/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CAC-3'
E-AAC/M-CTT	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CTT-3'
E-AAC/M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CTC-3'
E-AAC/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CAT-3'
E-AGA/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC AGA-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CAT-3'
E-AGG/M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CTC-3'
E-AGG/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CAT-3'
E-AGG/M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG-3' 5'-GATGAGTCTCTGAGTAA CTG-3'

对银染之后得到的电泳带谱进行统计, 将每个条带视为一个位点, 有带记为 1, 无带记为 0, 将 DNA 条带的有无转化成 1、0 数据矩阵, 统计总位点

数和多态位点数。由于 AFLP 属于显性标记, 因此将扩增位点上有带视为显性基因型, 无带视为隐性纯合基因型。用 POPGENE 1.32 软件统计多态位点比例 (P)、平均有效等位基因数 (N_e)、 N_{ei} 遗传多样性指数 (H)、Shannon 多样性指数 (I)、遗传距离 (D) 等。UPGMA 系统树由 MEGA 4.0 软件构建。

2 结果

2.1 AFLP 的扩增结果

采用 8 对 AFLP 引物对 4 个群体共 120 个个体进行 DNA 扩增。共得到 498 个 AFLP 位点, 多态位点比例为 56.02%。每对引物扩增位点在 43—90 个之间, 平均每对引物扩增出 62.25 个 AFLP 位点。扩增位点最多的引物对是 E-AGA/M-CAT, 扩增位点数为 90 个, 扩增位点最少的引物对是 E-AGG/M-CAT, 扩增位点数为 43 个。其中, E-AAC/M-CTT 引物对产生的位点多态比例最低, 为 49.30%; E-AAC/M-CAT 引物对产生的位点多态比例最高, 为 62.03% (表 2)。8 个引物对在 4 个半滑舌鲷群体中检测出位点数分别为: 479 个(唐山野生)、452 个(江苏连云港野生)、467 个(山东海阳养殖)、438 个(福建漳州养殖), 多态位点数及比例分别为: 225(45.18%)、199(39.96%)、189(37.95%)、188(37.75%), 两个野生群体多态位点比例均高于两个养殖群体。没有发现可以区分 4 个群体的特异性条带。图 1 为引物 E-AGA/M-CAT 在 4 个群体中的扩增图谱。

2.2 半滑舌鲷四个群体的遗传多样性

由表 3 可知, 河北唐山野生群体和江苏连云港野生群体的多态位点百分数分别为 45.18%和 39.96%,

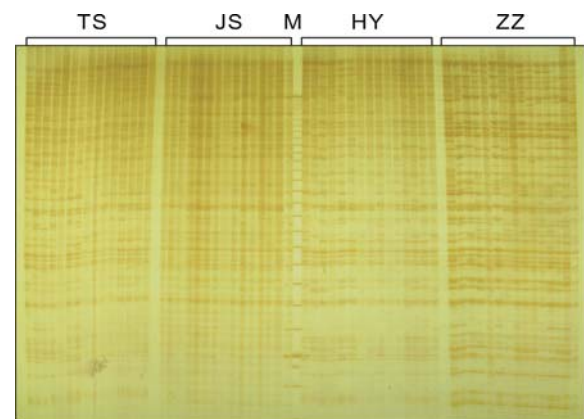


图 1 E-AGA/M-CAT 引物扩增得到的半滑舌鲷 AFLP 指纹图
Fig.1 AFLP band patterns generated by primer combinations of E-AGA/M-CAT

表 2 半滑舌鳎群体不同引物的扩增位点数及多态位点比例

Tab.2 Numbers of band and percentage of polymorphic loci amplified by different primer sets of *C. semilaevis* populations

引物	总扩增 位点数	总多态位点数 及比例(%)	不同群体多态位点数及多态位点比例(%)			
			TS	JS	HY	ZZ
E-AAC/M-CAC	63	33 (52.38)	27 (44.26)	24 (39.34)	23 (36.51)	24 (38.10)
E-AAC/M-CTT	71	36 (49.30)	29 (42.03)	24 (38.82)	22 (32.83)	21 (35.00)
E-AGG/M-CTG	57	33 (57.89)	31 (56.36)	24 (50.00)	25 (51.02)	22 (47.83)
E-AGA/M-CAT	90	54 (60.0)	46 (51.69)	47 (53.41)	42 (47.19)	48 (54.55)
E-AGG/M-CTC	49	27 (55.10)	20 (43.48)	12 (31.58)	12 (31.58)	14 (34.15)
E-AGG/M-CAT	43	23 (53.48)	15 (36.59)	12 (34.29)	10 (28.81)	14 (37.84)
E-AAC/M-CTC	46	24 (52.17)	20 (44.45)	14 (35.00)	12 (31.58)	11 (30.56)
E-AAC/M-CAT	79	49 (62.03)	37 (50.68)	42 (56.00)	39 (52.70)	34 (50.75)

注: TS 为唐山野生群体, JS 为江苏连云港野生群体, HY 为山东海阳养殖群体, ZZ 为福建漳州养殖群体

表 3 半滑舌鳎四个群体的遗传多样性指标

Tab.3 Genetic diversity of the four populations of *C. semilaevis*

群体	多态位点数	$P(\%)$	H	I	N_e
唐山野生群体	225	45.18	0.1159	0.1817	1.1884
江苏连云港野生群体	199	39.96	0.1059	0.1663	1.1704
山东海阳养殖群体	189	37.95	0.1046	0.1629	1.1696
福建漳州养殖群体	188	37.75	0.1015	0.1587	1.1635
平均	200.25	40.21	0.1070	0.1674	1.1729

Nei 遗传多样性指数分别为 0.1159 和 0.1059, Shannon 多样性指数分别为 0.1817 和 0.1663, 平均有效等位基因数分别为 1.1884 和 1.1704; 山东海阳养殖群体和福建漳州养殖群体的多态位点百分数分别为 37.95% 和 37.75%, Nei 遗传多样性指数分别为 0.1046 和 0.1015, Shannon 多样性指数分别为 0.1629 和 0.1587, 平均有效等位基因数分别为 1.1696 和 1.1635。

图 2 为半滑舌鳎群体显性基因频率的分布图, 把显性基因型频率划分为点频率为 0 的区间及其他 10 个区间, 由于显性基因型频率为 100% 的位点数远远大于其他区间上的位点数, 故未将其作为一个区间。结果显示, 四个群体扩增位点基因型频率在不同区间分布呈现一定的规律性, 反映了四个群体遗传结构的特点。四个群体显性基因频率分布基本一致, 都

在区间 1%—9% 出现峰值(图 2)。说明四个群体间遗传结构基本相似。

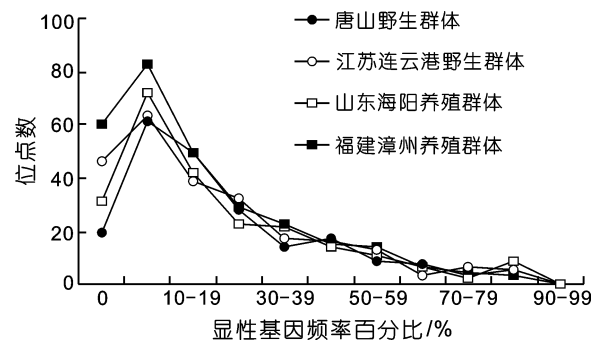


图 2 半滑舌鳎群体显性基因频率分布

Fig.2 Distributions of amplified loci in different frequency intervals of the four *C. semilaevis* populations

表 4 半滑舌鳎 4 个群体间的遗传距离

Tab.4 Genetic distance of the four populations of *C. semilaevis*

群体	唐山野生	江苏连云港野生	福建漳州养殖	山东海阳养殖
唐山野生	—			
江苏连云港野生	0.0665	—		
福建漳州养殖	0.0648	0.0664	—	
山东海阳养殖	0.0820	0.0779	0.0778	—

2.3 半滑舌鳎四个群体间的遗传分化

半滑舌鳎群体间遗传距离为 0.0648—0.0820, 平均遗传距离为 0.0725, 群体间遗传距离见表 4。半滑舌鳎四个群体间的遗传分化系数为 0.3047, 基因流为 1.1410; 半滑舌鳎野生群体间遗传距离为 0.0665, 遗传分化系数为 0.2052, 基因流为 1.9371。根据遗传距离构建了四个群体的 UPGMA 系统树, 其中唐山野生群体与福建漳州养殖群体先聚成一支, 然后与江苏连云港野生群体聚成一支, 最后与山东海阳养殖聚成一大支(图 3)。

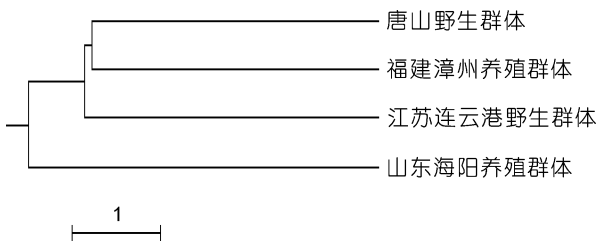


图 3 半滑舌鳎 4 个群体的 UPGMA 聚类图

Fig.3 Dendrogram of UPGMA in the four populations of *C. semilaevis*

3 讨论

AFLP 分析结果表明, 半滑舌鳎群体的遗传多样性与我国其他的一些经济鱼类相比, 处于中等偏下水平(表 5), 可见半滑舌鳎遗传多样性状况不容乐观。半滑舌鳎自然资源量本来就少, 活动范围小, 更容易受到环境污染及其他人类活动的影响, 因此, 应及时采取措施保护半滑舌鳎资源, 如建立原种场和保护区等。此外, 唐山野生群体(渤海)的遗传多样性高于江苏连云港野生群体(黄海), 这与韩志强等(2007)研究结果相反, 可能由于取样地点的不同以及所采用的引物不尽相同的原因。半滑舌鳎数量分布的趋势:

渤海及黄海北部>黄海南部>东海>南海(李思忠等, 1995)。一般来说, 群体越大, 蕴含的遗传多样性越丰富, 这与本文中渤海群体遗传多样性水平高于黄海群体的结果一致。

半滑舌鳎两个养殖群体(山东海阳养殖群体、福建漳州养殖群体)的遗传多样性低于两个野生群体(唐山野生群体、江苏连云港野生群体), 这与国内学者对大黄鱼(黎中宝等, 2009)及牙鲆(张全启等, 2004)野生与养殖群体的遗传多样性的研究结果一致。这可能与其养殖过程中由于亲本数量少引起的遗传瓶颈效应及其伴随发生的遗传漂变和近交衰退等有关(黎中宝等, 2009)。养殖鱼类在遗传多样性水平上的丧失往往与一些种质退化现象, 如生长缓慢、成鱼个体小、性成熟提早、抗病能力下降、肉质变差等有着一定的联系, 对养殖业的发展有着不利影响。Sugama 等(1988)发现人工繁殖的真鲷的等位基因数减少了 12.2%, 多态座位数减少了 40%。张全启等(2004)发现牙鲆养殖群体中 1%—9%低频位点数少于野生群体, 而隐性纯合位点明显高于野生群体, 养殖群体的一些稀有位点存在丢失, 低频位点数减少。常建波等(2011)采用等位酶分析也发现养殖群体较野生群体在低频位点 *Sod-1b* 存在缺失, 但 AFLP 的显性频率分布研究表明 4 个群体显性基因频率分布基本一致, 养殖群体遗传结构与野生群体相近, 养殖群体在低频位点数相比野生群体并无明显减少。这可能与半滑舌鳎人工养殖历史较短, 主要采用野生亲鱼进行养殖生产有关, 但遗传多样性的降低说明养殖群体面临遗传瓶颈、近交衰退等潜在危害, 因此在以后的养殖过程中应保持选育亲本的数量, 定时更换亲鱼, 注意对选育群体的遗传多样性的检测, 以保持舌鳎养殖产业的持续健康发展。

表 5 鱼类遗传多样性的 AFLP 研究

Tab.5 Genetic diversity in different fish populations revealed by the AFLP method

群体	$P(\%)$	H	文献
大黄鱼	40.53—45.14	0.102—0.124	黎中宝等, 2009
真鲷	64—58.4	—	王志勇等, 2001
紫红笛鲷	57.14	—	张俊彬等, 2004
牙鲆	46.18	0.1093—0.1225	张全启等, 2004
引进萨罗罗非鱼	16.6	—	赵金良等, 2007
呼玛河哲罗鱼	84.43	—	匡友谊等, 2007
黄姑鱼	51.70	0.0996—0.1022	韩志强等, 2006
岩原鲤	46.89	—	宋君等, 2005
半滑舌鳎	44.5—49.8	0.0646—0.0979	韩志强等, 2007
半滑舌鳎	39.96—45.18	0.1059—0.1159	本研究

黄、渤海半滑舌鲷野生群体间遗传距离为 0.0665, 遗传分化系数为 0.2052。本文的研究结果与韩志强等(2007)的研究结果基本一致($D = 0.0936$; $G_{ST} = 0.1428$)。常建波等(2011)采用等位酶技术对黄、渤海半滑舌鲷野生群体的研究表明, 两个群体间遗传距离仅为 0.0006, 同工酶(庄志猛等, 2006)、RAPD 及 Cyt *b* 基因序列分析(韩志强等, 2007)研究均表明黄、渤海半滑舌鲷群体间没有显著的遗传差异。本研究得出的显性频率分布结果揭示, 养殖群体与野生群体的遗传结构基本相似, 养殖群体与野生群体间没有明显的遗传分化。聚类分析中唐山野生群体与福建漳州养殖群体聚成一支, 可能是由于福建漳州养殖群体苗种取自山东招远, 而山东招远与唐山同处渤海海域, 并且养殖群体为野生子一代, 因此聚为一支。

目前各地半滑舌鲷的资源量都显著下降, 因此有必要对其野生资源状况有更多的了解, 应该在半滑舌鲷分布区域设立更多采样点, 以对其遗传变异情况进行深入研究跟踪监测, 从而为制订合理的资源保护措施提供可靠的理论依据。

参 考 文 献

- 王志勇, 王艺磊, 林利民等, 2001. 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. 水产科学, 25(4): 289—293
- 匡友谊, 佟广香, 尹家胜等, 2007. 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析. 中国水产科学, 14(4): 616—621
- 庄志猛, 韩志强, 马爱军等, 2006. 黄、渤海半滑舌鲷种群遗传结构的同工酶分析. 海洋水产研究, 27(2): 10—15
- 李思忠, 王惠民, 1995. 中国动物志: 硬骨鱼纲蝶形目. 北京: 科学出版社, 34—366
- 宋 君, 宋昭彬, 岳碧松等, 2005. 长江合江江段岩原鲤种群遗传多样性的 AFLP 分析. 四川动物, 24(4): 495—499
- 张全启, 徐晓斐, 齐 洁等, 2004. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多样性分析. 中国海洋大学学报, 34(5): 816—820
- 张俊彬, 黄良民, 2004. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析. 热带海洋学报, 23(5): 50—55
- 赵金良, 王伟伟, 李思发等, 2007. 我国引进萨罗罗非鱼群体的 AFLP 遗传指纹. 上海水产大学学报, 16(3): 293—296
- 柳学周, 庄志猛, 马爱军等, 2005. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究. 海洋水产研究, 26(2): 25—32
- 柳学周, 徐永江, 兰功刚, 2006. 几种重金属离子对半滑舌鲷胚胎发育和仔稚鱼的毒性效应. 海洋水产研究, 27(2): 33—41
- 姜言伟, 万瑞景, 陈瑞胜, 1993. 渤海半滑舌鲷人工育苗工艺技术的研究. 海洋水产研究, 14: 25—33
- 倪海儿, 郑志明, 2002. 几种舌鲷的形态和生长特性的比较. 海洋科学, 12(26): 61—64
- 常建波, 雷光高, 黎中宝等, 2011. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)群体遗传结构的研究. 海洋与湖沼, 42(1): 114—118
- 韩志强, 庄志猛, 高天翔等, 2007. 半滑舌鲷 DNA 的群体遗传变异. 中国水产科学, 14(2): 192—200
- 韩志强, 高天翔, 王志勇等, 2006. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析. 水产学报, 30(5): 640—646
- 黎中宝, 方 秀, 陈 锦等, 2009. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖群体遗传多样性的降低. 海洋与湖沼, 40(4): 446—450
- Sugama K, Taniguchi N, Umeda S, 1988. An experimental study on genetic drift in hatchery population of red sea bream. Nippon Suilsa Gakkaishi, 54(5): 739—744
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 3: 4407—4414

COMPARISON OF GENETIC DIVERSITY OF WILD AND CULTIVATED POPULATIONS OF *CYNOGLOSSUS SEMILAEVIS*

LI Zhong-Bao, LEI Guang-Gao, CHANG Jian-Bo, ZHAO Bin-Li,
CHEN Jin, ZHANG Gui-Ling, WANG Zhan-Lin

(Fishery College, Jimei University, Xiamen, 361021; Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen, 361021)

Abstract Genetic diversity of wild and cultivated populations (4 populations) of *Cynoglossus semilaevis* were analyzed using the AFLP method. A total of 498 loci were detected from 120 individuals using eight AFLP primer combinations. The results from AFLP technique showed that there was a loss of the genetic diversity in cultivated populations of *C. semilaevis* compared to wild populations. The percentages of polymorphic loci, the Nei's gene diversity, Shannon's information index and the mean effective number of alleles per locus in two wild populations were 39.96%—45.18%, 0.1059—0.1159, 0.1663—0.1817 and 1.1704—1.1884, respectively; in contrast, those of the two cultivated populations were 37.75%—37.95%, 0.1015—0.1046, 0.1587—0.1629 and 1.1635—1.1696, respectively. Genetic distance among the 4 populations varied from 0.0648—0.0820 with a mean of 0.0725.

Key words *Cynoglossus semilaevis*, AFLP, Population, Genetic diversity