

## 斑鳊不同地理群体遗传变异的 AFLP 分析

王伟伟<sup>1,2</sup> 赵金良<sup>1</sup> 李思发<sup>1</sup> 王传杰<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学,农业部水产种质资源与利用重点开放实验室,上海 201306; 2. 山西农业大学,动物科技学院,太谷 030801; 3. 山西省沁水县畜牧局,沁水 048200)

**摘要:**斑鳊(*Siniperca scherzeri* Steindachner)为东亚地区特有的淡水名贵经济鱼类。受生态环境破坏和渔业捕捞过度的影响,斑鳊野生资源已呈下降趋势。为探明我国斑鳊不同地理群体的遗传背景,采用 AFLP 分子标记技术研究了鸭绿江、海河、长江、钱塘江、闽江、西江 6 个地理群体的遗传特征和群体分化。斑鳊 65 尾个体中,8 对引物组合共扩增出 211 条带,其中多态性条带 126 条,多态比例为 59.7%,并观察到一些群体的特异性条带。群体内的遗传变异以长江群体最大(6.7%),群体间的遗传距离明显大于群体内的遗传距离。AMOVA 分析表明,斑鳊 6 群体间的总遗传分化指数  $F_{st} = 0.7850$  ( $p < 0.01$ ),群体间遗传分化极显著。聚类分析表明:斑鳊不同群体内的所有个体均单独聚群,6 个地理群体明显分为南北两大群,鸭绿江群体和海河群体聚为一支,长江、钱塘江、闽江和西江四个群体聚为另一支。斑鳊较高水平的遗传变异与其地理分布范围广,在不同的生态环境下积累了大量突变有关。不同地理群体间已产生了明显的遗传分化,其遗传亲缘关系与其地理分布格局基本一致,推测横亘于我国内陆中部地区、呈东西走向的秦岭山脉的形成可能是东亚斑鳊最先出现南北间群体分化的主要原因。

**关键词:**斑鳊;群体;遗传变异;AFLP

**中图分类号:**Q347 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)02-0304-06

斑鳊(*Siniperca scherzeri* Steindachner)属鲈形目(Perciformes),鳊属(*Siniperca*),为东亚特有的名贵经济鱼类之一。广泛分布于我国内陆水域,朝鲜和越南也有少量分布<sup>[1,2]</sup>。由于天然水域生态环境不断遭到人为破坏以及渔业上的捕捞过度,斑鳊野生资源已呈下降趋势<sup>[3]</sup>。最近,斑鳊人工繁殖技术取得了成功<sup>[4,5]</sup>。随着人工繁育群体的不断扩大、异地引种养殖及生产管理不善等都可能对当地群体造成遗传“污染”。为探明我国斑鳊不同地理群体的遗传背景,我们开展了斑鳊群体遗传特征的系列相关研究<sup>[6,7]</sup>。

扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)是一种新型的 DNA 多态性的分子标记<sup>[8]</sup>。该技术具有谱带丰富、多态性高,结果稳定、重复性好等特点,已在水生动物的遗传多样性、种质研究与鉴定、群体间亲缘关系和系谱分析中得到了广泛的应用<sup>[9-12]</sup>。本研究利用 AFLP 分子标记技术对我国斑鳊主要地理群体

的遗传特性进行研究,以期进一步了解斑鳊群体的遗传特性和遗传分化,为其遗传保护和合理利用提供科学依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 斑鳊 6 个地理群体的样本分别采集于鸭绿江(YL)、海河(HH)、长江(YZ)、钱塘江(QT)、闽江(MJ)、西江(XJ)(表 1)。剪取活鱼的尾鳍,于 95%乙醇中固定和保存。

**1.2 AFLP 实验** 总 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》<sup>[13]</sup>,取 20—30mg 酒精固定的尾鳍,剪碎,待酒精完全挥发后,用蛋白酶 K(20mg/mL)56℃消化过夜(约 10h),酚-氯仿法提取总 DNA。AFLP 实验方法参照文献[8],引物和接头序列参照文献[14]。基因组 DNA 使用 6 碱基的 *EcoR* I 和 4 碱基的 *Mse* I 限制性内切酶酶切反应 4h,与接头连接反应 12h,预扩增产物稀释 100 倍作为选择性扩增的模板。*EcoR* I 的核心序列为 5' GAC TGC GTA CCA ATT C 3',*Mse* I 的核心序列为 5' GAT GAG TCC

收稿日期:2007-01-19;修订日期:2008-05-12

基金项目:上海市教委项目(05KZ02);上海市重点学科建设项目(Y1101)资助

作者简介:王伟伟(1979—),女,山西沁水人;助教;主要从事水产动物遗传与育种研究。E-mail:sxndweiwei@163.com

通讯作者:赵金良,E-mail:jlzhao@shou.edu.cn

TGA GTA A 3'。接头、引物皆由上海生工生物工程有限服务公司合成。内切酶和连接酶购自 New England Biolab 公司, *Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自

北京天为时代公司。PCR 扩增产物采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后,用 10% 冰醋酸固定,银染技术染色和显色。

表 1 斑鳊采集地点和分析样本数

Tab. 1 Population, sampling location and number of *S. scherzeri* in this study

群体 Population	采集地点 Sampling location	样本数 Number
鸭绿江 Yalujiang River (YL)	辽宁省宽甸县水丰水库	12
海河 Haihe River (HH)	河南省鹤壁市盘石头水库	5
长江 Yangtze River (YZ)	安徽省池州市秋浦河	14
钱塘江 Qiantangjiang River (QT)	浙江省淳安县千岛湖	14
闽江 Minjiang River (MJ)	福建省顺昌县富屯溪	6
西江 Xijiang River (XJ)	广西壮族自治区融水县融江	14

**1.3 统计分析** 根据凝胶电泳结果,选择清晰的条带进行统计分析。每个 DNA 条带视为一个分子标记,在同一位点,当 AFLP 谱带存在时赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,将整个分子标记图谱转化成“0”、“1”的数字矩阵。用 Arlequin3.0 软件<sup>[15]</sup>中的分子变异分析 (AMOVA) 方法计算遗传分化指数 ( $F_{st}$ ),并检验  $F_{st}$  的显著性 (重复次数为 1000)。用 MEGA3.0 软件<sup>[16]</sup>基于 Kimura 2-parameter 模型计算群体内、群体间的遗传距离,并进行 NJ 聚类分析,置信度用 bootstrap 1000 次重复抽样检验结点的支持率。

## 2 结果与分析

### 2.1 八对引物组合扩增结果

每个群体中取部分样品模板 DNA,使用 64 对引物组合进行扩增预实验。然后,选择条带清晰性好、多态性较高的 8 对引物组合 E-AAC/M-CAA、

E-AAG/M-CAC、E-AAG/M-CTA、E-ACA/M-CAA、E-ACA/M-CTA、E-ACA/M-CTC、E-ACT/M-CAA、E-ACT/M-CTC 对全部样品进行扩增。

8 对引物在 65 尾斑鳊个体中共扩增出 211 条条带 (表 2)。其中,多态性带 126 条,多态比例为 59.7%,平均每对引物组合产生 16 条多态性标记。E-ACA/M-CAA 组合扩增出的条带最多,36 条。E-ACA/M-CTA 组合扩增出的多态性带最高 (23 条),多态比例 82.1%;E-ACT/M-CTC 扩增出的多态性带最少 (8 条),多态比例为 47.1%。

不同群体中发现了一些群体的特异性标记带。鸭绿江群体特有带 3 条,海河群体特有带 3 条,长江群体特有带 3 条,钱塘江群体特有带 3 条,西江群体特有带 2 条,闽江群体未发现特有带。鸭绿江和海河共有的标记带 7 条,长江和钱塘江共有的标记带 2 条,钱塘江和闽江共有的标记带 1 条。图 1 为 E-ACA/M-CTA 引物组合扩增的 AFLP 指纹图。

表 2 斑鳊 8 对 AFLP 引物组合的扩增结果

Tab. 2 Amplification results of 8 AFLP primer combinations of *S. scherzeri*

引物 Primer	总带数 Total bands	多态性带数 Polymorphic bands	多态性比例 Percentage of polymorphism (%)
E-AAC/M-CAA	34	19	55.9
E-AAG/M-CAA	29	21	72.4
E-AAG/M-CTA	19	13	68.4
E-ACA/M-CAA	36	11	30.6
E-ACA/M-CTA	28	23	82.1
E-ACA/M-CTC	27	15	55.6
E-ACA/M-CAA	21	16	76.2
E-ACT/M-CTC	17	8	47.1

### 2.2 群体内和群体间的遗传距离

不同水系群体内和群体间的遗传距离 (表 3)。

群体内,长江群体内的遗传变异最大 (0.067),闽江次之 (0.066),钱塘江的最小 (0.038)。

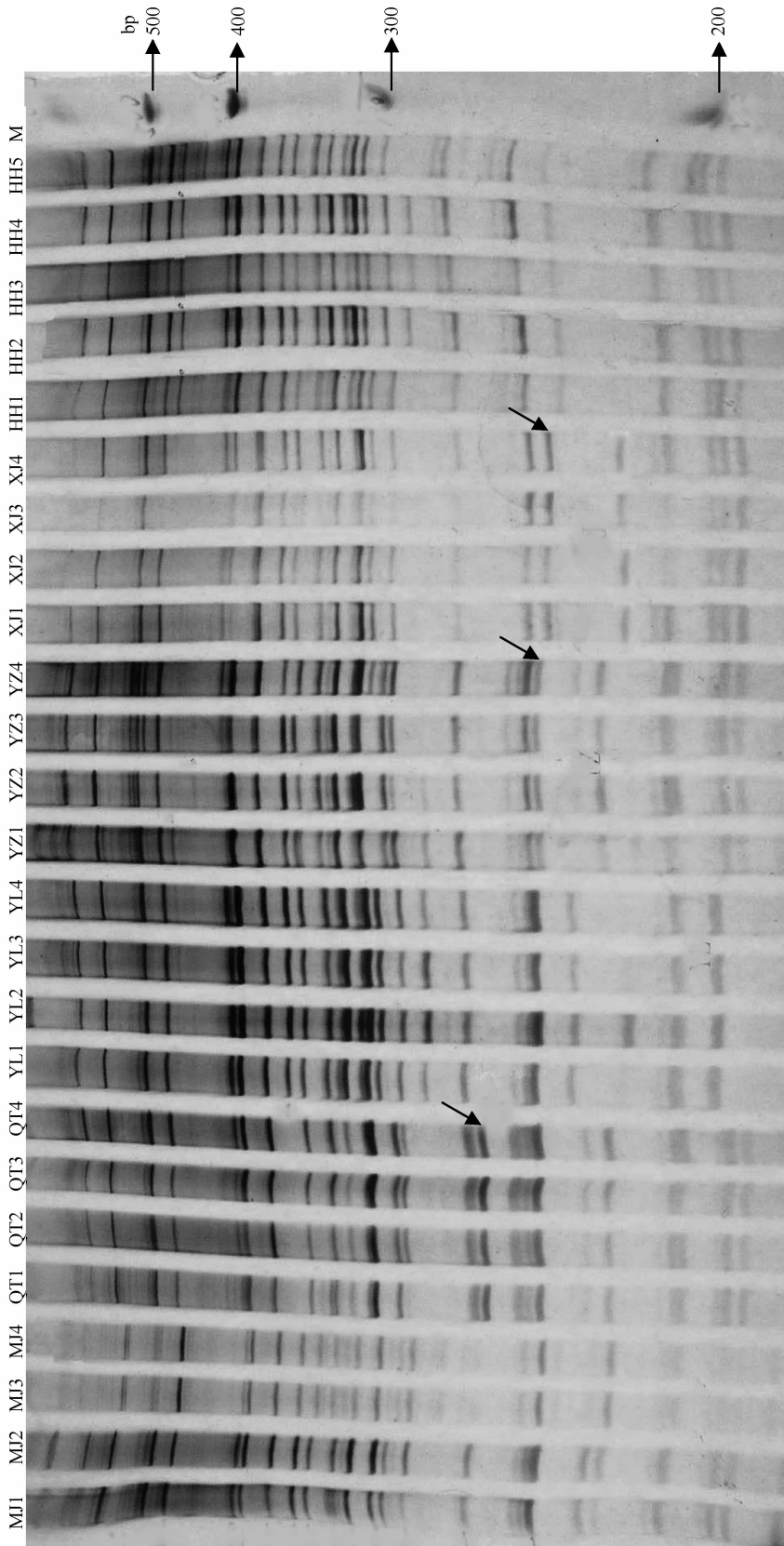


图 1 E-ACA/M-CTA 引物扩增获得的斑鳅群体 AFLP 指纹

Fig. 1 AFLP patterns of different populations of *S. scherzeri* by primer E-ACA/M-CTA

箭头从左到右依次表示钱塘江、长江、西江、西江的特异性带

Arrows from left to right indicated the specific bands of Qiantangjiang, Yangtze and Xijiang population, respectively

鸭绿江与海河群体间的遗传距离最小(0.134),长江、钱塘江、闽江、西江群体间的遗传距离为0.157—0.246,鸭绿江和海河群体与长江、钱

塘江、闽江、西江群体间的遗传距离为0.290—0.422,群体间的遗传距离明显大于群体内的遗传距离。所有个体的总体平均遗传距离为0.238。

表3 斑鳊群体内和群体间的遗传距离

Tab. 3 Genetic distances within and among 6 populations of *S. scherzeri*

	鸭绿江 YL	海河 HH	长江 YZ	钱塘江 QT	闽江 MJ	西江 XJ
鸭绿江 YL	0.044					
海 河 HH	0.134	0.052				
长 江 YZ	0.385	0.384	0.067			
钱塘江 QT	0.424	0.394	0.215	0.038		
闽 江 MJ	0.299	0.281	0.214	0.219	0.066	
西 江 XJ	0.290	0.278	0.210	0.246	0.157	0.042

### 2.3 遗传分化指数

斑鳊6群体的 AMOVA 分析表明(表4),在遗传差异的总方差中,21.50%的差异来自各群体内,

78.50%的差异来自群体间,总的遗传分化指数  $F_{st}$  为0.7850,6斑鳊群体间有极显著的遗传分化( $p < 0.01$ )。

表4 斑鳊6群体间遗传差异的分子方差分析表(AMOVA)

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 6 populations of *S. scherzeri*

变异来源 Source of variation	自由度 d. f.	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比例 Percentage of variance (%)
群体间 Among pop	5	996.43	18.39	78.50
群体内 Within pop	59	297.26	5.04	21.50
总变异 Total variation	64	1293.69	23.43	100

### 2.4 聚类分析

用 MEGA3.0 软件对 65 个斑鳊个体进行聚类分析,得到 NJ 树(图2)。65 个斑鳊个体明显的分为两大类群,鸭绿江群体和海河群体聚为一支,长江、钱塘江、闽江、西江 4 个群体聚为另一支。且不同群体内的所有个体均能单独聚群。

## 3 讨论

### 3.1 斑鳊群体的遗传变异水平

根据 8 对引物组合在斑鳊 6 个不同地理群体中的检测结果,斑鳊群体的平均多态位点比例为 59.7%,个体间的平均遗传距离为 23.8%,表明斑鳊具有较丰富的遗传多样性,这与斑鳊不同地理群体 mtDNA 控制区、Cyt *b* 的序列分析结果基本一致<sup>[5,6]</sup>。斑鳊为东亚广布种类,自然分布区南北跨度 20 个纬度,栖息环境、气候条件存在很大的差异,在不同的生态环境条件下,经历长期进化积累形成了较丰富的遗传变异。长江群体内的遗传变异最高,这可能与长江流域范围广,分布区向西延伸至四川境内,群体数量庞大,遗传变异最为丰富有关。

### 3.2 斑鳊群体间的遗传分化与分布格局

群体间遗传距离表明,鸭绿江与海河群体间的遗传距离,长江、钱塘江、闽江、西江群体间的遗传距离均低于鸭绿江、海河群体与长江、钱塘江、闽江、西江群体间的遗传距离。6 群体间的遗传分化指数 ( $F_{st}$ ) 为 0.785 ( $p < 0.01$ ),这表明了我国斑鳊 6 个地理群体间存在极显著的遗传分化。这可能与斑鳊起源早、分布范围广,在不同的地理生态环境下经历了长期遗传隔离分化而成。群体中还发现有一些特异性 AFLP 标记带,这些可作为斑鳊不同地理群体间遗传判别的分子标记。

聚类分析表明,不同群体内的所有个体均能单独聚群,6 个群体明显分为两支,鸭绿江群体和海河群体聚为一支,构成了北方群体;长江、钱塘江、闽江和西江四个群体聚在一起,构成了南方群体。其中,长江与钱塘江群体先聚合,然后与闽江群体聚合,最后与西江群聚合。这一关系较 mtDNA 控制区和 Cyt *b* 的序列分析有了更深入的揭示<sup>[6,7]</sup>。由于 AFLP 结果反映的是 nDNA 的遗传信息,遗传方式为孟德尔遗传,而 mtDNA 反映的是核外基因组 DNA 的遗传信息,呈母系遗传,二者反映的遗传信息、遗传方

式、进化速率、遗传变异等均不相同,也导致了上述不同研究结果间产生一定的差异。

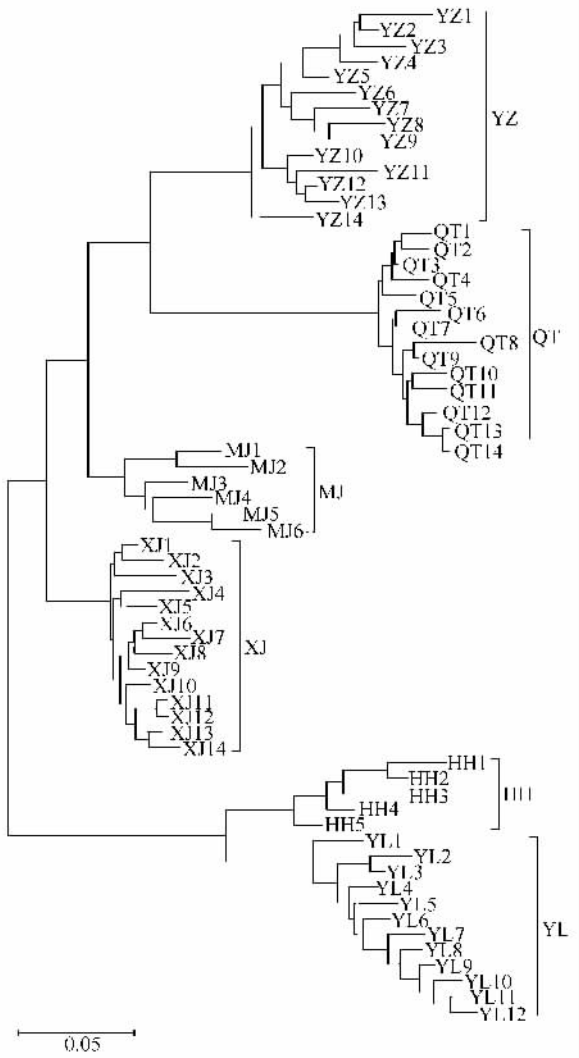


图2 斑鳅6群体 AFLP 的 NJ 树

Fig. 2 NJ tree of 6 populations of *S. scherzeri* by AFLP

群体间的聚类关系表明,斑鳅最先产生了南北群体间的遗传分化,群体间的遗传关系与其地理分布格局基本一致。秦岭山脉横亘我国内陆中部地区,呈东西走向,是长江水系与黄河水系的重要分水岭。秦岭南北坡鱼类区系具有明显的差异,表明秦岭的形成对鱼类类群的分布起到了阻限作用<sup>[17]</sup>。它的形成还可能是东亚斑鳅最先出现南北间群体分化的主要原因。北方群体中鸭绿江群体与海河群体之间的亲缘关系较近,可能与地质史上鸭绿江和海河同属于古黄河水系,较晚时期才开始分化有关<sup>[18,19]</sup>。南方群体间的遗传关系可能暗示了斑鳅在向东南亚南部扩散后,产生了相应的遗传隔离后逐渐形成。对斑鳅遗传结构特征的深入研究可为东亚

淡水鱼类的起源进化、生物地理学研究提供新的证据<sup>[20]</sup>。

## 参考文献:

- [1] Zhou C W, Yang Q, Cai D L. On the classification and distribution of the sinipercinae fishes (Family Serranidae) [J]. *Zoological Research*, 1988, **9**(2): 113—125 [周才武, 杨青, 蔡德霖. 鳊亚科鱼类的分类整理和地理分布. 动物学研究, 1988, **9**(2): 113—125]
- [2] Li S Z. Geographic distribution of the sinipercinae fishes [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1991, **26**(4): 40—44 [李思忠. 鳊亚科鱼类地理分布的研究. 动物学杂志, 1991, **26**(4): 40—44]
- [3] Liang X F. Study on mandarin fish and its culture home and abroad [J]. *Fisheries Science and Technology information*, 1996, **23**(1): 13—17 [梁旭方. 国内外鳊类研究及养殖概况. 水产科技情报, 1996, **23**(1): 13—17]
- [4] Wu L X, Zou B. Morphology of embryonic development of *Siniperca scherzeri* from Biliuhe Reservoir [J]. *Fisheries Science*, 1993, **12**(9): 5—8 [吴立新, 邹波. 碧流河水库斑鳅胚胎发育的形态观察. 水产科学, 1993, **12**(9): 5—8]
- [5] Wang Q Y, Zeng K W, Xia R L. Techniques for artificial propagation of *Siniperca scherzeri* [J]. *Inland Fisheries*, 2005, **30**(6): 39—41 [王青云, 曾可为, 夏儒龙. 斑鳅的人工繁殖技术研究. 内陆水产, 2005, **30**(6): 39—41]
- [6] Wang W W, Zhao J L, Li S F. Genetic variation of the mitochondrial DNA control region among 5 populations of *Siniperca scherzeri* Steindachner in China [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, **15**(4): 398—402 [王伟伟, 赵金良, 李思发. 我国斑鳅不同群体 mtDNA 控制区序列的遗传变异. 上海水产大学学报, 2006, **15**(4): 398—402]
- [7] Wang W W, Zhao J L, Li S F. Genetic variation of the mitochondrial DNA *cyt b* among 6 populations of *Siniperca scherzeri* Steindachner in China [J]. *Zoological Research*, 2006, **27**(6): 589—593 [王伟伟, 赵金良, 李思发. 我国斑鳅六个群体 mtDNA *Cyt b* 序列的遗传变异. 动物学研究, 2006, **27**(6): 589—593]
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acid Research*, 1995, **23**(21): 4407—4414
- [9] Wang Z Y, Wang Y L, Lin L M, et al. Genetic polymorphisms in wild and cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* using AFLP fingerprinting [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(3): 198—202 [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. 中国水产科学, 2002, **9**(3): 198—202]
- [10] Zhang J B, Huang L M. Analysis of genetic diversity of *Lutjanus argentimaculatus* by AFLP molecular technique [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2004, **23**(5): 50—55 [张俊彬, 黄良民. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析. 热带海洋学报, 2004, **23**(5): 50—55]
- [11] Liu B Q, Dong W Q, Wang Y J, et al. Identification of germ plasm

- in *Pseudosciaena crocea* Tai-Chu race by AFLP [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(4):413—416 [刘必谦,董闻琦,王亚军,等.岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析.水生生物学报, 2005, **29**(4):413—416]
- [12] Zhang L S, Kong X Y, Yu Z N, *et al.* Application and prospects of AFLP in genetics studies of aquatic animals [J]. *High Technology Letters*, 2003, **13**(4):95—98, 104 [张留所,孔晓瑜,喻子牛,等. AFLP 技术在水生动物遗传学研究中的应用及前景展望.高技术通讯, 2003, **13**(4):95—98, 104]
- [13] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd Edition [M]. Huang P T, Wang J X, Zhu H C, *et al.*, translation. Beijing: Science Press. 2002 [萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第三版). 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译.北京:科学出版社. 2002]
- [14] Qi X, Lindhout R. Development of AFLP markers in barley [J]. *Molecular General Genetics*, 1997, **254**:330—336
- [15] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis [M]. Berne: Computational and Molecular Population Genetics Laboratory (CMPG), University of Berne, Switzerland. 2006
- [16] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**:150—163
- [17] Chen J X, Xu T Q, Fang S M, *et al.* Fishes in Qinling Mountain Area [M]. Beijing: Science Press. 1986, 215—224 [陈景星,许涛清,方树森,等.秦岭鱼类志.北京:科学出版社. 1986, 215—224]
- [18] Xie Y H. Ichthyofauna of the Liaohe [C]. *Transactions of the Chinese Ichthyological Society*, 1981, **2**:111—120 [解玉浩. 辽河的鱼类区系. 鱼类学论文集, 1981, **2**:111—120]
- [19] Xie Y H. The fish fauna of the Yalu River [C]. *Transactions of the Chinese Ichthyological Society*, 1986, **5**:91—100 [解玉浩. 鸭绿江的鱼类区系. 鱼类学论文集, 1986, **5**:91—100]
- [20] Liu H Z. A preliminary analysis to biogeographical process of the eastern Asia freshwater fishes [J]. *Acta Zootaxon Sinica*, 1998, **23**(supplement):49—55 [刘焕章. 东亚淡水鱼类生物地理学过程的初步研究. 动物分类学报, 1998, **23**(增刊):49—55]

## GENETIC VARIATION OF *SINIPERCA SCHERZERI* STEINDACHNER FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL POPULATIONS BY AFLP ANALYSIS

WANG Wei-Wei<sup>1,2</sup>, ZHAO Jin-Liang<sup>1</sup>, LI Si-Fa<sup>1</sup> and WANG Chuan-Jie<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; 3. Bureau of Animal Husbandry of the Qinshui County, Qinshui 048200)

**Abstract:** *Siniperca scherzeri* Steindachner, a high-valued freshwater fish, is endemic in East Asia. However, its natural resource has declined by the destruction on its ecological environment and excessive capture in fisheries. To investigate and understand its overall genetic background, genetic characteristics and divergences of *Siniperca scherzeri* Steindachner from Yalujiang River, Haihe River, Yangtze River, Qiantangjiang River, Minjiang River and Xijiang River were analyzed by AFLP methods. Eight primer pairs were selected from 64 *EcoR* I / *Mse* I primer combinations and used for further practical AFLP analysis. Total 211 bands were scored in 65 individuals with 126 polymorphic bands (59.7%), some population specific bands were also observed. The genetic variation of Yangtze population was the highest (6.7%) among 6 populations, and genetic distances of inter-population were higher than that of intra-population. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there was significantly genetic differentiation among 6 populations ( $p < 0.01$ ). NJ analysis showed that each population formed one group independently, the 6 geographic populations could be obviously grouped into two distinct clades. Yalujiang and Haihe populations are clustered in one clade, Yangtze, Qiantangjiang, Minjiang and Xijiang populations are clustered in another clade. The abundance of genetic variance of *S. scherzeri* in China maybe resulted from accumulation of a large numbers of mutations under wide distribution ranges in different ecosystems. Genetic divergence among 6 geographical populations are significant, moreover, the genetic relationships are consistent with their geographical distribution. The formation of Qinling Mountains, which lies across the central China from west to east, was invoked to explain the distinct divergence between the northern group and the southern group.

**Key words:** *Siniperca scherzeri*; Population; Genetic variation; AFLP