

福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究

王志勇¹, 王艺磊¹, 林利民¹, 邱淑贞², 岡本信明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:对福建官井洋大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)野生种群和2个养殖群体进行5对选择性引物(共37个标本)的AFLP分析。结果表明,共检出503个不同的扩增片段(50~450 bp),每对引物扩增出的片段数目为76~155个;在5对引物检出的扩增片段中,101个(20.1%)为全部37个受试个体共有,312个(62.0%)为部分野生与养殖个体共有,53个(10.5%)仅见于野生个体,37个(7.4%)仅见于养殖个体,养殖群体中出现野生种群所没有的扩增片段;野生种群、养殖1、养殖2多态片段比例分别为76.6%、70.6%、69.2%,遗传差异度分别为0.246 4、0.232 2、0.229 9,养殖群体多态片段比例与个体间的遗传差异度均低于野生种群。养殖群体的遗传多样性水平较低,遗传变异相对贫乏。

关键词:大黄鱼;野生种群;养殖群体;AFLP;多态性

中图分类号:S917;Q595.483

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0198-05

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国海水鱼类养殖中规模最大的种类。但经过连续多代的人工繁殖和养殖,养殖大黄鱼的经济性状出现了明显退化,亟需进行遗传改良。迄今,仅全成干等^[1-2]报道了大黄鱼的染色体组型和养殖群体9种同工酶的多态性,王军等^[3]报道了官井洋大黄鱼遗传多样性的RAPD分析,但对大黄鱼AFLP标记的研究尚未见报道。

AFLP技术^[4]在水产生物研究上的应用已有报道^[5-14]。王志勇等^[12-14]曾用该技术分别研究了印度尼西亚不同群系的鲤、中国沿海不同地理种群的真鲷以及日本15个不同的虹鲷雌核发育克隆品系的遗传变异,证明该技术是一种灵敏有效的鱼类种群遗传多态性研究和种质鉴别手段。本研究对福建官井洋大黄鱼野生种群与养殖群体AFLP指纹的多态性进行了初步研究分析,旨在为大黄鱼种质优化提供基础依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1999年8月在福建省宁德市官井洋海区捕捞到15尾野生大黄鱼,个体重100~150 g,养殖大黄鱼于同一时间采自同一海区的养殖网箱,其中养殖1(12尾)和养殖2(10尾)分别来自宁德市水产技术推广站试验场和该地区1个个体育苗场所繁育的鱼苗,二者都是1985~1990年该海区的野生亲鱼经5~7代人工繁殖的后代,但参与繁育的亲本数量不同。鱼样自捕捞后,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AFLP分析。

1.2 基因组DNA的提取和AFLP指纹图谱的构建

采用蛋白酶K+苯酚/氯仿法从固定于酒精中的鱼鳍提取基因组DNA^[13],用GIBCO BRL的AFLP分析试剂盒(AFLPTM Analysis system I)构建AFLP指纹图谱,操作方法与反应液的组成参见文献^[12]。

1.3 数据分析

多态片段比例 = (多态片段数量/检出片段总数) × 100%

个体间的遗传差异度或群体间的遗传距离 = 1 - 相似系数

收稿日期:2001-08-10.

基金项目:福建省重大科技项目(2001Z009).

作者简介:王志勇(1963-),男,副教授,硕士,从事水产生物遗传育种和生物技术研究. E-mail: zywang@jmu.edu.cn

其中:相似系数按 Lynch 的公式^[15]计算,即: $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。式中 S_{ij} 为相似系数, N_{ij} 为个体 i 与 j 共有片段的数量, N_i 、 N_j 分别为个体 i 与 j 各自具有片段的数量。

2 结果

2.1 不同选择性引物对大黄鱼 DNA 的扩增和多态性检出效果

本研究用 5 对选择性引物,从 37 尾大黄鱼的 DNA 中共检出了 503 个不同的扩增片段(50~450 bp,不清晰的片段不计)。每对引物扩增出的片段数目为 76~155 个,平均 100.6 个,以 E-AAC/M-CAA 扩增出的片段最多, E-ACG/M-CAG 扩增出的片段最少。其中多态片段的比例则以 E-ACG/M-CTT 最高,达 90.8%,而 E-AGG/M-CTG 最低,为 69.1%,如表 1 所示。AFLP 标记的遗传符合孟德尔定律^[6],因此在数据分析中可将 1 个扩增片段视为 1 个基因,1 个个体的扩增片段组合即为该个体的基因型。表 1 显示,5 对引物检出的基因型数目都与使用的标本数目相一致,即每个个体的扩增图谱都与其他个体的有所不同,表明各尾试验鱼之间在 DNA 序列上都存在差异,所用引物都能够有效地检测出这种差异。

表 1 5 对选择性引物从大黄鱼基因组中扩增出的不同片段数和基因型数

Table 1 Numbers of amplified bands and genotypes observed from AFLP analysis of *P. crocea* by 5 couples of primer sets

引物 Primer sets	样本数 Samples	检出片段 Detected bands	多态片段 Polymorphic bands, N(%)	基因型数 Genotypes
E-AAC/M-CTC	37	88	71(80.7)	37
E-AAC/M-CAA	37	155	120(77.4)	37
E-ACG/M-CTT	37	87	79(90.8)	37
E-ACG/M-CAG	37	76	65(85.5)	37
E-AGG/M-CTG	37	97	67(69.1)	37
总数 Total		503	402	185

2.2 野生与养殖大黄鱼 AFLP 指纹的差异及分子标记

5 对引物所检出的扩增片段中,101 个(20.1%)为全部 37 个受试个体所共有,312 个(62.0%)为部分野生与养殖个体所共有,53 个(10.5%)仅见于野生个体,37 个(7.4%)仅见于养殖个体。一些在野生种群与养殖群体都出现的多态性片段,在野生种

群的出现频率很低,在养殖群体的出现频率较高,二者的差异甚为显著;这些片段和出现频率较高的野生种群或养殖群体特有的扩增片段(见图 1),构成养殖群体 AFLP 指纹图谱区别于野生种群 AFLP 指纹图谱的最明显特征。后 2 类片段在一定程度上可以作为野生与养殖个体体质鉴别的辅助标记(见表 2)。

表 2 野生种群与养殖群体特有的部分 AFLP 标记

Table 2 Parts of the specific AFLP markers observed in wild and cultured population

标记名称* Marker name	野生种群 Wild population	养殖群体 Cultured population
AAC/CTC-136	Absent	Present
AAC/CAA-88	Present	Absent
AAC/CAA-103	Absent	Present
ACG/CAG-64	Absent	Present
ACG/CTT-59	Absent	Present
ACG/CTT-125	Absent	Present
AGG/CTG-72	Present	Absent
AGG/CTG-192	Absent	Present

* 标记名称 = 引物名称 + 标记片段大小(bp)。

Marker name = Primer name + Fragment size (bp)。

2.3 多态片段比例与群体内和群体间的遗传差异度

5 对引物从大黄鱼野生种群与养殖群体标本检出的不同扩增片段数目依次分别为 466 个(野生种群)、415 个(养殖 1)和 390 个(养殖 2),如表 3 所示。群体内个体间的遗传差异度(平均值)野生种群为 0.246 4,2 个养殖群体分别为 0.232 2 和 0.229 9,也以野生种群为高。野生种群与 2 个养殖群体间的遗传差异度(遗传距离),大于各种群或群体内部的遗传差异度、以及养殖 1 与养殖 2 之间的遗传距离(表 4)。

表 3 野生种群与养殖群体的多态片段数量及其比例

Table 3 Polymorphic bands observed in wild and cultured populations of *P. crocea*

标本 Samples	检出片段 Detected bands	多态片段 Polymorphic bands	多态片段比例/% Percentage of polymorphic bands
野生种群 Wild fish	466	357	76.6
养殖 1 Cultured 1	415	293	70.6
养殖 2 Cultured 2	390	270	69.2

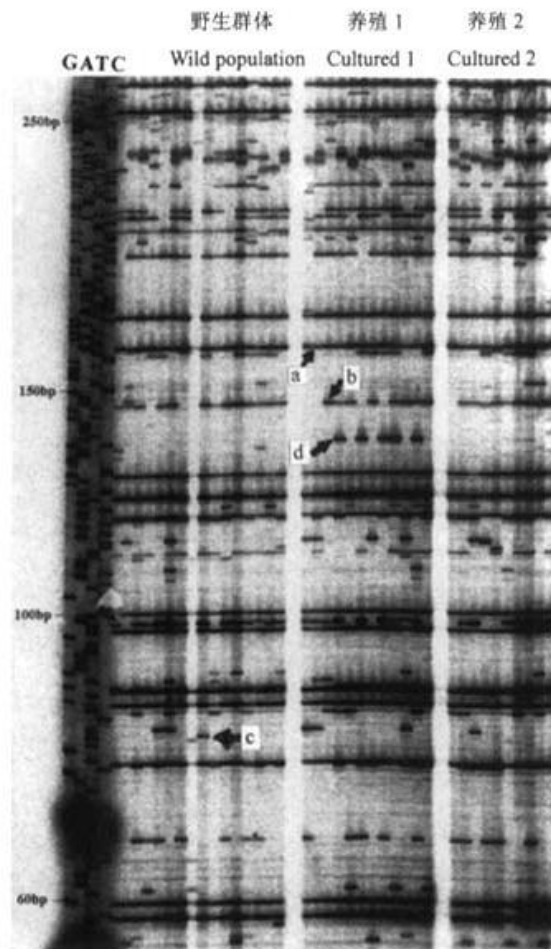


图1 用E-AAC/M-CTC引物扩增获得的大黄鱼AFLP指纹图(局部)

Fig.1 AFLP patterns of wild and cultured large yellow croaker using primer set E-AAC/M-CTC

左边4个泳道为DNA分子量标记物。→分别表示4种类型的扩增谱带。a—单态性片段;b—野生个体与养殖个体共有的多态性片段;c—野生个体特有的片段;d—养殖个体特有的片段。The left 4 lanes are M13 DNA size marker. Arrows indicated the 4 types of the amplified bands. a—single-morphic bands, b—polymorphic bands detected in both wild and cultured stocks, c—polymorphic bands detected only in wild stock, d—polymorphic bands detected in cultured population.

表4 野生与养殖大黄鱼种群或群体内及群体间的遗传差异度

Table 4 Values of average genetic difference within and between populations of *P. crocea*

标本 Samples	野生种群 Wild fish	养殖1 Cultured 1	养殖2 Cultured 2
野生种群 Wild fish	0.2464 ± 0.0196	0.2482 ± 0.0193	0.2508 ± 0.0202
养殖1 Cultured 1		0.2322 ± 0.0268	0.2381 ± 0.0230
养殖2 Cultured 2			0.2299 ± 0.0287

3 讨论

本研究结果再次证明了AFLP指纹技术对于DNA多态性有着很高的检出灵敏度,是进行鱼类种质鉴别(包括个体鉴别)的有效手段。

AFLP指纹分析中多态片段比例和遗传差异度为衡量鱼类群体遗传多态性和群体间亲缘关系与遗传距离,提供了有用的比较与判别尺度^[9,12]。表3、4的结果显示,官井洋大黄鱼养殖群体多态片段比例与个体间的遗传差异度都低于野生种群,说明养

殖群体的遗传多样性水平较低,遗传变异相对贫乏。该结果与全成干等^[2]用同工酶、王军等^[3]用 RAPD 法分析获得的结果相一致。这可归因于养殖群体的起源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作用,如福建闽东地区目前养殖的大黄鱼,基本上来源于 1985~1986 年大黄鱼人工繁殖研究课题组从当地海区捕捞、保活的 30 多尾亲鱼。同工酶的研究^[2]已证明养殖群体的平均杂合度低于野生群体。本研究显示有相当一些扩增片段在养殖群体中的出现频率甚高,但在野生群体的出现频率则很低,显然这是由于近交以及遗传漂变等作用,使得在野生种群中存在的频率不高的一些基因片段,在养殖群体中的频率大大提高了。目前生产上出现的养殖大黄鱼性状退化(生长延缓、抗病力下降)现象,与养殖群体遗传多样性水平的低下以及连续多代近交导致不良基因纯合化有很大的关系。此外,从本研究获得的 AFLP 指纹图谱来看,养殖群体中出现了野生种群所没有的扩增片段,其数量占检出片段总数的 7.4%,暗示着在养殖群体中可能发生了野生种群所没有的遗传变异,即突变。绝大多数突变是有害的,这或许也是导致当前养殖群体性状退化的部分原因。

从表 4 可以看出,野生种群与养殖群体之间的遗传差异度大于野生种群内部以及 2 个养殖群体之间的遗传差异度。这说明经过连续多代相对隔离的繁殖,加上各自群体内基因突变的作用,养殖群体已经与野生种群产生了一定的遗传趋异(Genetic divergence)。但是,本研究使用了 5 对选择性引物,分析了 503 个不同的扩增片段,尚未发现可供进行野生与养殖大黄鱼种质鉴别的充分稳定可靠的标记谱带(即全部野生个体共有而养殖个体都没有,或者全部养殖个体共有而野生个体都没有的谱带)。我们认为,这是因为养殖群体与野生种群隔离繁殖的时间还不长,而且养殖群体迄今没有作过定向选育,遗传基础还较为复杂、不纯,2 种群体间的遗传趋异还不大的缘故。当群体间的遗传趋异较大(例如在不同的物种或者亚种之间)、或者遗传纯合度较高时,容易找到稳定的 DNA 分子标记^[9,11-12]。此外,近几年来大规模发展网箱养殖后,由于台风袭击等原因,每年都有相当多的养殖群体后代流入官井洋海区,给野生种群带来种质的混杂和污染,这可能也是一个重要原因。

致谢:本研究承蒙福建省宁德市水产技术推广站黄光亮工程师协助采集标本,集美大学水产学院洪惠馨教授和宁德市水技站刘家富高级工程师审阅原稿并提出宝贵的意见,谨此一并致谢!

参考文献:

- [1] 全成干,王 军,丁少雄,等. 大黄鱼染色体核型研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2000,39(1):107-110.
- [2] 全成干,王 军,丁少雄,等. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1999,38(4):584-587.
- [3] 王 军,全成干,苏永全,等. 大黄鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋学报,2001,23(3):87-91.
- [4] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [5] 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, 2:238-255.
- [6] 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.
- [7] Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting[J]. Tree, 1999, 14(10):389-394.
- [8] Liu Z, Nichols A, Li P, et al. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids[J]. Mol Gen Genet, 1998, 258(3): 260-268.
- [9] 高木基裕,曾我部五郎,谷口順彦. 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]. 水産育種,1998,26: 55-61.
- [10] 中村佳代,尾崎照遠,岡本信明. AFLP-BSA 法を用いたニジマス優性アルパノ遺棄子の特定[A]. 日本水産学会 1999 年春季大会演習要旨集[C], 日本:日本水産学会,1999,118.
- [11] 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,1999,6(1):1-4.
- [12] Wang Z, Jayasankar P, Khoo S K, et al. AFLP fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia [J]. Asian Fisheries Science, 2000(13):139-147.
- [13] 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.
- [14] Wang Z Y, Khoo S K, Ozaki A, et al. Studies on the genetic variation in rainbow trout clones using AFLP fingerprinting and microsatellite DNA marker analysis[A]. The Third World Fisheries Congress Abstracts Book [C], 2000. 382.
- [15] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7:478-484.

Genetic polymorphisms in wild and cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* using AFLP fingerprinting

WANG Zhi-yong¹, WANG Yi-lei¹, LIN Li-min¹, KHOO Sock Kean², OKAMOTO Nobuaki²

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

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

Abstract: The wild individuals of *Pseudosciaena crocea* were collected from Guanjing Sea area, East China Sea. The cultured individuals were collected from two cultured populations in two different culture farms in Fujian Province, which were artificially breeding $F_5 - F_7$. Totally 37 individuals were used. Five primer pairs (E - AAC/M - CTC, E - AAC/M - CAA, E - ACG/MCAG, E - ACG/M - CTT, E - AGG/M - CTG) were used and 503 selectively amplified fragments were detected, ranging from 50 to 450 bp in size, and the number of fragments produced by each pair of primers were 76 - 155. Among the 503 fragments, 101 bands presented in the total 37 individuals, and 312 bands only presented in part of the wild fish and the cultured, 37 only in the cultured, 53 only in the wild. In the cultured individuals, some fragments presented were not found in the wild individuals. The mean percentages of polymorphic bands of the three populations varied from 69.2% to 76.6% and the mean genetic differences within populations varied from 0.229 9 to 0.246 4, and the maximums all presented in the wild population, indicating the cultured populations had lower polymorphisms. The average genetic distance between the wild and the cultured populations is larger than that between the two cultured populations.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; wild population; cultured population; AFLP; polymorphism

(P254 continued)

Selection and enzymatic study of carrageenan-decomposing strain

MOU Hai-jin, JIANG Xiao-lu, JIANG Xuan, GUAN Hua-shi

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: The carrageenan decomposing strain M-2 was selected from the surfaces of some species of sea algae and the enzymology properties and decomposing products were analyzed. The results show that the carrageenase is an inducible enzyme with thermolability; the optimal activity is at pH 6 - 8 and temperature 32 - 38 °C; the activity can be affected by several ions like Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} . The enzyme decomposing products were determined as carrageenan tetrasaccharide and hexasaccharide by MALDI - TOF - MS, so it comes to the conclusion that the enzyme from M - 2 is κ -carrageenase.

Key words: carrageenan; carrageenase; enzymatic properties; enzyme decomposing products