

AFLP 分析 3 个不同体色花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异

刘伟斌¹, 曾志南¹, 王德祥², 刘波¹, 柯才焕²

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过 AFLP 技术对中国东南沿海的 3 个不同体色花尾胡椒鲷 (*Plectorhinchus cinctus*) 养殖群体进行了遗传分析。6 对引物组合从 3 个群体中扩增出 370 个位点, 其中多态位点比例为 49.5%, 每对引物组合扩增的片段为 51~71 条, 平均 61.3 条, 每对引物组合多态位点检出率为 39.4%~56.5%。正常群体、白色和灰色变异群体的多态位点比例分别为 41.4%、36.3%、34.3%, 平均杂合度分别为 0.114 5、0.088 7 和 0.083 7。遗传多样性衡量指标表明, 正常花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异量相对最大, 遗传多样性相对较高, 白色变异群体次之, 而灰色变异群体最低, 白色变异群体和灰色变异群体两者间遗传多样性差异并不显著 ($P>0.05$), 显示变异群体的遗传多样性降低。正常群体与白色群体之间的遗传距离 (0.035 4) 最大, 遗传相似系数最小 (0.965 2)。同时, 遗传分化系数 F_{st} (0.136 2) 和 AMOVA 方差分量百分比 (10.68%) 也表明群体间存在着一定程度的遗传结构分化, 说明对体色这一特定表型性状的人为定向选育对花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异产生一定的影响。[中国水产科学, 2008, 15 (1): 38~46]

关键词: 花尾胡椒鲷; 养殖群体; 体色变异种; AFLP; 遗传变异

中图分类号: Q959

文献标识号: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0038-09

花尾胡椒鲷 (*Plectorhinchus cinctus*) 是中国东南沿海和台湾省的重要海水养殖鱼类^[1-2]。它隶属鲈形目 (Perciformes) 石鲈科 (Pomadasyidae) 胡椒鲷属 (*Plectorhinchus*), 自然分布于印度-西太平洋海域, 由琉球至南中国海, 以及斯里兰卡海域和阿拉伯海, 为暖温性近海中下层鱼类, 主要栖息于近海沿岸的岩礁海区, 分布深度在 50 m 以内水域^[3]。

由于国内外对其人工繁殖和育苗技术研究开展较早, 到 20 世纪 90 年代中后期大陆和台湾基本实现规模化全人工繁育和养殖。在人工育种过程中, 正常花尾胡椒鲷群体先出现了体白黑眼的白色变异种, 白色变异种又分化出数量相对较小的灰色变异种 (除了体背、背鳍和尾鳍上无褐色斑点外, 体色比正常稍浅)。变异种和正常花尾胡椒鲷在外部形态特别是体色上存在差异。目前, 中国对花尾胡椒鲷的发育生物学、生态生理特性和繁育技术的研究较广泛深入^[4-6]。但遗传方面的研究较少, 曹伏君等^[7-8]分析了花尾胡椒鲷染色体组型, 并比较研究了花尾胡椒鲷和胡椒鲷的 5 种同工酶, 丁少雄等^[9]采用 PAGE 电泳等位酶分析方法检测正常体

色人工繁育群体的遗传多样性水平。

AFLP 技术为中性选择 DNA 分子遗传标记技术, 具有检测遗传变异灵敏、无需 DNA 序列信息、可追踪基因和重复可靠性高等优点^[10], 而广泛应用于鱼类和其他水生生物的基因定位克隆^[11]、种质监测鉴定^[12]、系统发生进化^[13]、遗传图谱构建^[14]和种群遗传结构特别亲缘关系较近的生物个体或群体的遗传多样性的分析^[15-16]等诸多领域。本研究采用 AFLP 技术分析不同体色的花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异和分化程度, 评估其遗传结构, 探讨人工繁养殖对其遗传多样性的影响, 以期为其遗传育种和种群演变的研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

3 种不同体色的养殖群体于 2004 年 7 月期间同一时间采自不同海区的养殖网箱, 正常体色的花尾胡椒鲷取样于福建省诏安湾海区, 白色变异种取样于福建省佛昙湾海区, 灰色群体取样于广东省柘林湾海区。每个群体各 30 尾, 体长 6~12 cm, 活体运回实验室, 保存于 -80 °C 低温保存, 待用。

收稿日期: 2007-05-08; 修订日期: 2007-07-20.

基金项目: 福建省海洋与渔业局重点项目 (闽渔科 0371).

作者简介: 刘伟斌 (1970-), 男, 助研, 硕士, 从事海水养殖及水产遗传育种研究. E-mail: xmluiweibin@yahoo.com.cn

通讯作者: 曾志南. E-mail: xmzzn@sina.com

1.2 基因组DNA萃取

随机抽取每群体各 12 尾个体, 分别剪取各个体背部肌肉组织约 100 mg, 离心洗涤处理后, 按 Genomic DNA 萃取试剂盒 (美国 Promega 公司) 指南离析提取基因组 DNA, 经由 0.8% 琼脂糖凝胶检取完整、无降解的 DNA 样品, 4℃ 保存待用。

1.3 AFLP反应

AFLP 实验流程参照 Vos 等^[17] 方法操作, 稍加变动。经过预实验, 从 36 对引物中筛选 6 对选

择性扩增引物组合分别为 *Eco*RI- ACC/*Mse*I-CAG、*Eco*RI-ACC/*Mse*I-CTC、*Eco*RI-ACC/*Mse*I-CAC、*Eco*RI-ACT/*Mse*I-CTC、*Eco*RI-AAC/*Mse*I-CAT 和 *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CAC 以供 AFLP 分析。AFLP 接头、预扩增引物和 6 对选用引物组合的序列见表 1。反应程序中所用主要药品均购自美国 Invitrogen 公司, 包括 AFLP 分析试剂盒 I。PCR 反应在 T3 型扩增仪 (德国 Biometra 公司) 上进行。

表 1 AFLP 分析所用的接头和引物序列
Tab.1 Adapter and primer sequences used for AFLP analysis

项目 Item	序列 Sequence
接头 Adapter	
<i>Eco</i> RI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>Mse</i> I	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
预扩增引物 Pre-amplification primer	
<i>Eco</i> RI+1	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>Mse</i> I+1	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
选择扩增引物 Selective amplification primer	
<i>Eco</i> RI-ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
<i>Eco</i> RI-ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
<i>Eco</i> RI-AAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3'
<i>Mse</i> I-CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
<i>Mse</i> I-CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTA ACTC-3'
<i>Mse</i> I-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTA ACAC-3'
<i>Mse</i> I-CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTA ACAT-3'

1.3.1 酶切反应及接头连接 反应体系含 5 × 酶切反应缓冲液 5 μL (50 mmol/L Tris-HCL pH 5, 50 mmol/L MgAc₂, 250 mmol/L KAc), DNA 样品 250 ng, *Eco*RI/*Mse*I 2 μL, 反应总体积为 25 μL。经 37℃ 水浴酶切 3 h 后, 70℃ 水浴 15 min, 加入 24 μL 接头 / 连接液 (*Eco*RI/*Mse*I 接头, 0.4 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgAc₂, 50 mmol/L KAc, 10 mmol/L Tris-HCL pH 7.5) 和 1 μL T₄ 连接酶 (1 U/μL), 20℃ 下反应 2 h。每个连接反应混合液定容为 10 μL, 加 TE (10 mmol Tris-HCL pH 8.0, 0.1 mmol/L EDTA) 稀释 10 倍, -20℃ 保存待用。

1.3.2 预扩增 反应总体积为 51 μL, 其中稀释酶切连接产物 5 μL, 预扩增引物混合物 40 μL, 10 × PCR 缓冲液 (200 mmol/L Tris-HCL pH 8.4, 15 mmol/L MgCl₂, 500 mmol/L KCl) 5 μL, *Taq*DNA 聚合酶

(5 U/μL) 1 μL。PCR 反应条件: 94℃ 30 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 进行 20 个循环。

1.3.3 选择性扩增 反应总体积为 20 μL, 其中预扩增稀释混合液 5 μL, *Eco*RI 引物 (27.8 ng/μL) 0.18 μL, *Mse*I 引物 (6.7 ng/μL, 1 mmol/L dNTPs) 4.5 μL, 10 × PCR 缓冲液 2 μL, *Taq*DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.12 μL, 加双蒸馏水至 20 μL。PCR 反应条件: 先 94℃ 3 min, 再 94℃ 30 s, 65℃ 45 s, 72℃ 80 s, 以后每循环退火温度降低 0.7℃, 共进行 12 个循环。然后转为 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 最后 72℃ 下延伸 3 min。扩增样品在 4℃ 下保存待用。

1.3.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染 在 55 W 恒压下预电泳 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (6% 丙烯酰胺, 0.30% 甲叉丙烯酰胺, 0.5 × TBE 缓冲液,

7 mmol/L 尿素) 2.5 h, 扩增样品与其 3/5 体积的上样缓冲液混合变性后, 每个样品 3 μ L 进行点样, 继续电泳 2 h。电泳完毕, 对胶板进行冰乙酸 (1%) 固定处理 20 min 和蒸馏水洗涤 2 次 (1 min/ 次) 后, 用染色液 (配方: 1.2 g AgNO₃, 1.6 mL HCHO, 3 mg Na₂S₂O₃·5H₂O/L 双蒸馏水) 染色 40 min, 用蒸馏水洗涤 2 次 (1×20 s, 1×30 s) 后, 再经显影液 (配方: 30 g N₂H₈CO₃/L 双蒸馏水) 摇荡处理至清晰条带显示, 冰乙酸 (1%) 停显色 2 min, 蒸馏水洗涤后, 室温下自然干燥, 统计带型, 数码拍摄存档。

1.4 数据统计与分析

根据每个个体在银染凝胶的不同迁移率处扩增条带的缺失或呈现进行统计, 转换成 0/1 数据矩阵, 用 AFLP Data Analyzer version 1.3^[18] 进行遗传参数统计 (Descriptive statistics), 计算每个群体的扩增条带数量 (N_t)、多态性条带数量 (N_p), 引物扩增及单群体多态位点比例 (P_1 、 P_2)、群体内和群体间的相似系数 (S_x/S_y 和 S_{xy})、群体间的遗传距离 (D_{xy}) 和样本个体基因型数目 (N_g) 参数。相似系数和遗传距离分别采用 Lynch^[19] (和 Nei^[20-21]) 计算公式:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$
$$D_{xy} = -\ln S_{xy}$$

公式中, N_{xy} 为样本个体 x 和 y 相同条带数量, N_x 、 N_y 分别为样本个体 x 和 y 各自条带数量。

平均杂合度 H_e 、无偏平均杂合度 H , 单群体 / 总群体的多态位点比例和群体遗传分化系数 F_{st} 通过 TFGPA 1.3 软件^[22] 分析计算。根据哈温平衡假设, H_e 和 F_{st} 分别采用 Lynch-Milligan^[23] 的 Taylor 展开法和 Weir-Cockerham^[24] 的 F - 统计分析估算, 基因流值 (N_m) 采用 Frankham 公式^[25] 计算:

$$\hat{w} = \sqrt{\hat{y} \{1 - \text{Var}(\hat{y}) / 8 \hat{y}^2\}}$$

$$N_m = [(1/F_{st}) - 1] / 4$$

其中, $\hat{w}$ 为 Lynch-Milligan(1994) 渐近无偏评估值, 即用以估算 F_{st} 参数所需的等位基因频率, $\hat{y}$ 为哑等位基因频率; F_{st} 为 Weir-Cockerham 的 F - 统计分析估算的 θ 值。

由于养殖群体内存在随机自交方式, 可把 AFLP 显性标记数据视为单体型 (Haplotype) 分子标记数据, 进行 AMOVA 分子方差分析^[26], 通过二阶分级 3 个不同体色养殖群体, 估算群体间和群体内个体间的方差分量 (Variance components) 及各方差分量的百分比, 以评估各级的遗传变异程度。

根据 Nei^[28-29] 遗传距离, 采用 MEGA 3 软件^[27], 以 UPGMA 和 NJ 法对 3 个不同体色养殖群体进行聚类分析, 构建群体间亲缘演化系统树图谱。同时, 用 MANTEL 检验^[22] 来评估遗传距离和样本地理距离的相关性。

2 结果与分析

2.1 AFLP扩增结果

通过 6 对引物组合, 从 3 个不同体色的花尾胡椒鲷养殖群体的 36 尾个体的 DNA 样品中, 在分子标记 100~900 bp 范围间, 检出 370 条清晰扩增片段, 多态片段 183 条, 总多态位点比例为 49.5%, 每对引物组合扩增的片段为 51~71 条, 平均 61.3 条, 每对引物组合多态位点检出率为 39.4%~56.5%。AFLP 标记符合孟德尔定律, 因此每个个体扩增片段组合可视为该个体基因型, 从表 2 可见, 6 对引物组合检出的基因型数与实验标本数一致, 表明了个体间存在 DNA 序列差异。图 1 为引物组合 *Eco*RI-ACC/*Mse*I-CTC 对 3 个花尾胡椒鲷群体的扩增图谱。

表 2 6 对引物组合从 3 个花尾胡椒鲷群体基因组中扩增统计的标记参数
Tab. 2 Genetic parameters generated from AFLP analysis of three *Plectorhynchus cinctus* stocks via 6 prime combinations

引物组合 Primer combination	样本数 Sample nos.	总条带 Total band	多态片段 Polymorphic band	多态位点比例 / % Percent polymorphic locus	基因型数 Genotype nos.
E-ACC/M-CAG	36	56	31	55.3	36
E-ACC/M-CTC	36	69	39	56.5	36
E-ACC/M-CAC	36	55	28	50.9	36
E-ACT/M-CTC	36	51	25	49	36
E-AAC/M-CAT	36	71	28	39.4	36
E-AAC/M-CAC	36	68	32	47.1	36
平均 Average	36	61.3	30.5	49.5	36

注: 表内多态位点比例为每对引物扩增出的多态片段占其扩增总条带数的百分率。
Note: Percent polymorphic loci here denotes the percentage of polymorphic bands over total bands generated by each prime combination.

2.2 群体内遗传变异

表 3 显示,6 对引物组合从正常花尾胡椒鲷养殖群体检出 353 个条带,白色变异群体 317 条带,灰色变异群体为 327 条带,其中多态位点数目分别为 146、115 和 112,比例为 41.4%、36.3% 和 34.3%。正常群体多态位点比例最高 (41.4%),灰色群体最低;而相似系数以灰色群体最大 (0.931 3),正常群体最小 (0.900 4)。

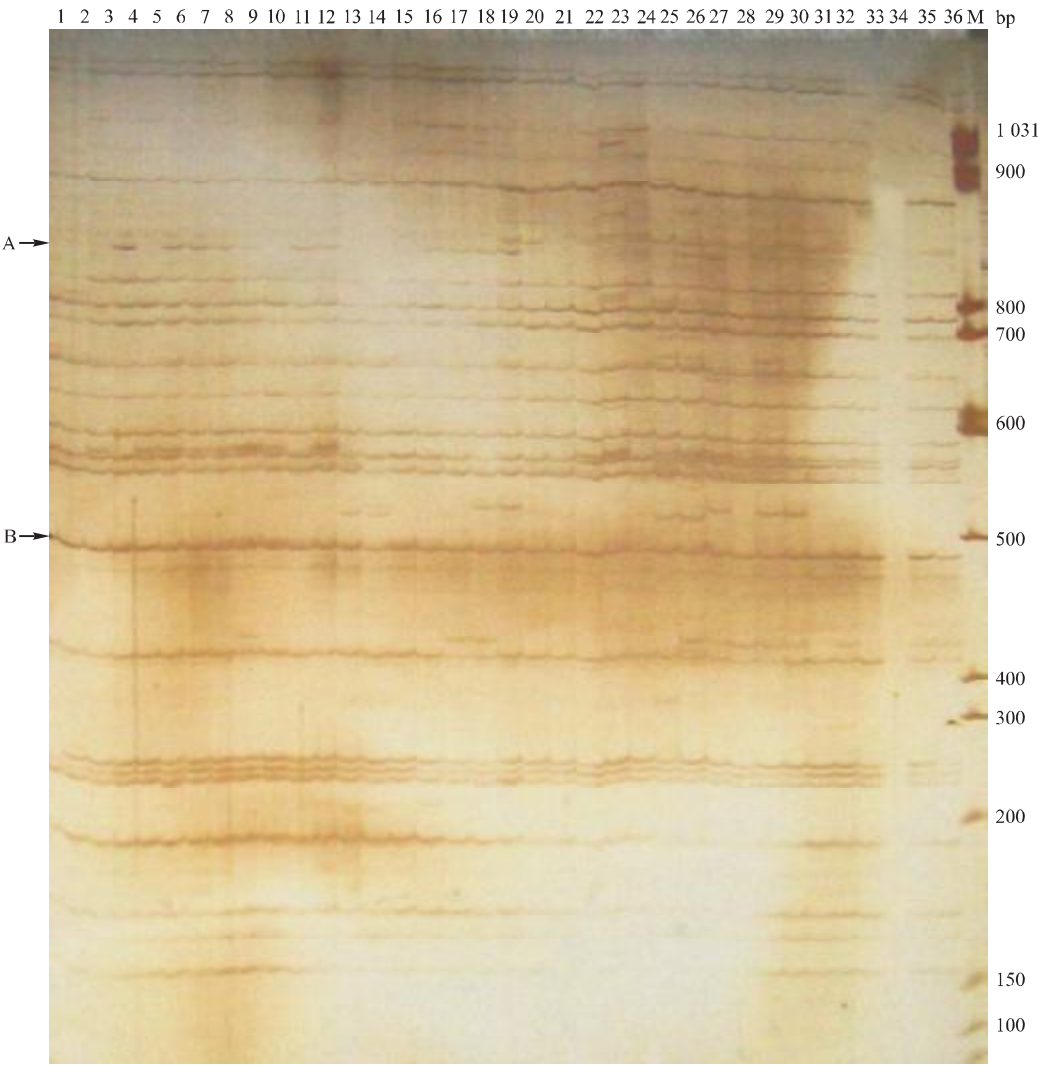


图 1 利用引物组合 *EcoRI*-ACC/*MseI*-CTC 进行 AFLP 反应的电泳图谱
M: 分子标记; 1~12: 花尾胡椒鲷白色群体; 13~24: 花尾胡椒鲷正常群体; 25~36: 花尾胡椒鲷灰色群体;
A: 多态片段; B: 单态片段

Fig.1 The electrophoresis map after AFLP reaction with *EcoRI*-ACC/*MseI*-CTC
M: DNA marker; 1~12: white stock of *P.cinctus*; 13~14: normal stock of *P.cinctus*; 25~36: grey stock of *P.cinctus*;
A indicates polymorphic bands; B indicates monomorphic bands

群体内平均杂合度即基因多样性,从表 4 可看出,以正常群体最高 (0.114 5),白色群体次之 (0.088 7),灰色群体最低 (0.083 7)。无偏平均杂合度也情况类似。在各群体多态位点占 3 个群体检出总位点的比例方面,正常群体 (39.4%) 比白色 (31.1%) 和灰色群体 (30.2%) 高,白色和灰色群体两者的比例基本相似。

表 3 6 对引物组合从 3 个群体内检出的扩增片段总数、多态位点比例和相似系数
Tab. 3 Numbers of bands, percent polymorphic loci and similarity coefficients generated by 6 prime combinations for three *P. cinctus* stocks

群体 Stock	检出条带 Detected bands	多态片段 Polymorphic bands	多态位点比例 /% Percent polymorphic loci	相似系数 Similarity coefficient	标准偏差 SD
正常体色 Normal	353	146	41.4	0.9004	0.0283
白色变异 White morph	317	115	36.3	0.9253	0.0277
灰色变异 Grey morph	327	112	34.3	0.9313	0.0251
平均 Mean			37.3	0.919	0.027

注：表内多态位点比例为 6 对引物组合从每个群体扩增出多态片段占该群体总条带数的百分率。
Note: Percent polymorphic loci here denotes the percentage of polymorphic bands over total bands generated by 6 prime combinations for each stock.

表 4 3 个群体内的杂合度、多态位点比例和遗传分化系数及基因流值
Tab.4 Heterozygosity, percent polymorphic loci, F_{st} and N_m of three *P. cinctus* stocks

群体 Stock	平均杂合度 Average heterozygosity	无偏平均杂合度 Unbiased average heterozygosity	多态位点比例 /% Percent polymorphic loci	F_{st}	N_m
正常体色 Normal	0.114 5	0.118 7	39.4		
白色变异 White orph	0.088 7	0.092 2	31.1		
灰色变异 Grey morph	0.083 7	0.088 9	30.2		
				0.136 2	1.59

注：表中多态位点比例为 6 对引物组合从每个群体扩增出的多态片段占 3 个群体检出总条带数的百分率。
Note: Percent polymorphic loci here denotes the percentage of polymorphic bands of each stock over total bands of three stocks generated by 6 prime combinations.

由此可见，以上数种种群的遗传多样性衡量指标表明，正常花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异量相对最大，遗传多样性相对较高，白色变异群体次之，而灰色变异群体最低，但白色变异群体和灰色变异群体两者间的差异并不显著 ($P>0.05$)。

2.3 群体间遗传分化

表 5 显示，花尾胡椒鲷正常群体与灰色变异群

体之间的遗传相似度较大 (0.983 7)，二者遗传距离较小 (0.016 4)。白色变异群体与正常群体的遗传距离则相对较大 (0.035 4) 相当于正常群体 / 灰色群体间 (0.016 4) 的 2 倍多，遗传相似度最小 (0.965 2)；灰色变异群体与白色变异群体间遗传相似度和遗传距离介于正常群体 / 白色变异群体和正常群体 / 灰色变异群体之间。

表 5 3 个花尾胡椒鲷养殖群体 AFLP 检出的扩增位点的相似系数和遗传距离
Tab.5 Similarity coefficients and genetic distances between amplified loci by AFLP for three *P. cinctus* stocks

群体 Stock	正常群体 Normal	白色变异 White morph	灰色变异 Grey morph
正常体色 Normal	****	0.965 2	0.983 7
白色变异 White morph	0.035 4	****	0.975 1
灰色变异 Grey morph	0.016 4	0.025 2	****

注：对角线以上数据为相似系数，对角线以下数据为遗传距离。
Note: Figures above/underneath diagonal are similarity coefficients and genetic distances respectively.

表 6 3 个花尾胡椒鲷养殖群体的 AMOVA 分析
Tab. 6 AMOVA analyses of three stocks of *P. cinctus*

变异来源 Source of variation	自由度 Degrees of freedom	方差总和 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异比例 /% Percentage of variation
群体间 Among stocks	2	84.647	0.203 61	10.68
群体内 Within stocks	33	289.417	1.702 87	89.32
总计 Total	35	374.118	1.906 48	

比较表 4 和表 6 可以看出,群体间的遗传分化系数 F_{st} 为 0.136 2,表明 86.38% 的遗传变异源于 3 个养殖群体内不同个体间的差异,而 13.62% 的变异来自群体间。AMOVA 分子方差分析也显示,10.68% 的遗传变异由群体间贡献,89.32% 的变异分布于群体内个体之间。

2.4 聚类分析和 Mantel 检验

图 3~4 显示,无论 UPGMA 法还是 NJ 法所构建系统树,正常群体和灰色群体聚类为一谱系枝,白色群体则独立为另一谱系枝,灰色/正常两群体间的亲缘关系较正常/白色两群体间或灰色/白色群体间的关系更密切。

采用 Mantel test 检测 3 个样本群体的地理距离和遗传距离的相关性 ($r=0.011\ 2$, $P=0.34$),显示了两之间没有相关性,这和苗种的随机分布养殖有关,而使得养殖群体间的亲缘关系与地理位置无关。

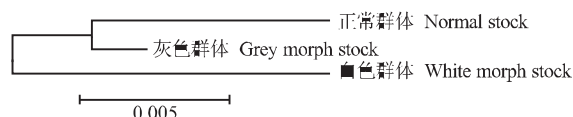


图 3 根据 Nei (1972, 1978) 遗传距离,用 NJ 法构建的 3 个养殖群体系统树图

Fig.3 Population-wise dendrogram revealed by NJ cluster analysis using the Nei (1972, 1978) genetic distance

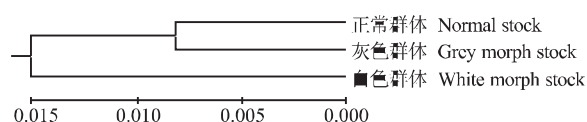


图 4 根据 Nei (1972, 1978) 遗传距离,用 UPGMA 法构建的 3 个花尾胡椒鲷养殖群体系统树图

Fig.4 *P. cinctus* population-wise dendrogram revealed by UPGMA cluster analysis using the Nei (1972, 1978) genetic distance

3 讨论

目前,国内外学者采用分子标记技术对鱼类种内不同体色变异群体遗传变异进行了研究探讨。杨发群等^[28]对鄱阳湖区大花鲢、细花鲢和隐花鲢 3 种不同体色黄鲢 (*Monopterus albus*) 的酯酶同工酶进行了研究,发现各种体色黄鲢的多态位点百分率为 100%,群体平均杂合度为 0.435 1 ~ 0.464 6,群体在酯酶同工酶系统各基因位点上具有较高的遗传变异水平。Yue 等^[29]利用 AFLP 和微卫

星分析人工繁养的红、金、青 3 种不同体色龙鱼 (*Scleropages formosus*) 群体的遗传多样性,认为该濒危物种群体遗传多样性目前相对处于高水平状态,且不同养殖群体存在分化,分化原因可能源自其原始种群地理分布上的隔阂。Kai 等^[30]采用 AFLP 分析无备平鲈 (*Sebastes inermis*) 的 3 种不同体色变异群体间的遗传变异,通过 5 个 AFLP 位点矩阵和位点频率来推论出变异种之间的生殖隔离。

本研究采用 AFLP 标记技术对花尾胡椒鲷的不同体色养殖群体进行遗传变异分析,结果表明,正常、白色和灰色 3 种体色相异群体的平均多态位点比例分别为 41.4%、36.3% 和 34.3%,平均杂合度分别为 0.114 5、0.088 7 和 0.083 7,这些数值远高于丁少雄等^[9]采用 PAGE 电泳等位酶方法对正常群体的遗传多样性的 20 种同工酶分析数据 (P : 8.33%; H_e : 0.005 37)。这可能是由于检测手段的差异而造成的。同时,丁少雄等认为花尾胡椒鲷养殖群体遗传变异处于低水平,而这种低水平可能是由于其亲本整体遗传多样性较低所致。一般认为,平均多态位点比例 (P) 和平均杂合度 (H_e) 是衡量生物群体遗传多样性高低的参数^[31],因此我们对一些同样通过 AFLP 分析的人工养殖海淡水鱼类的这两个遗传参数进行比较^[29, 32~36]。从表 6 可见,无论是平均多态位点比例还是平均杂合度,这 3 个不同花尾胡椒鲷群体的所得数值都相对处于低水平,表明花尾胡椒鲷养殖群体在整体水平上遗传多样性不高。这和丁少雄所得的结论基本一致。此外,Aliah^[37]采用微卫星分析日本新潟县的锦鲤遗传变异时,认为对锦鲤体色或体斑等特定表型性状的长期人为选育而导致其群体遗传变异水平降低。而从表 2、3 可见,相比于正常群体,白色和灰色群体的遗传多样性也呈下降趋势,遗传变异亦趋贫乏。这两者的结论趋于类似。

群体间的遗传距离揭示了群体遗传分化程度,从表 4 可见,白色变异群体与正常群体在 3 个群体间两两对比中的遗传距离则相对较大 (0.035 4),遗传相似度最小,反映了这两者已有分化倾向。本研究结果还表明群体遗传分化系数 F_{st} 为 0.136 2,AMOVA 方差分量数据显示群体间的变异比例为 10.68%。此外,聚类分析也显示,正常群体和白色群体归属于不同谱系分支,这些表明这 3 种不同体色变异群体中至少存在一定程度的遗传结构,反映了连续多代相对隔离的小群体人工育苗和养殖,鱼类

栖息环境变化的影响(从岩礁海区到网箱或土池)和基因突变的累积,以及由于奠基者效应和瓶颈效应而产生的遗传漂变,使不同体色的养殖群体已在一定程度上出现遗传分化,同时也表明人工对体色

这一特定表型性状的定向选育已对种群遗传结构产生某种程度的影响。这和 Palumi^[38] 在探讨海洋生物的遗传分化、生殖隔离和物种形成时,认为数量较小的种群间易产生遗传差异的论点相一致。

表 7 一些人工养殖海淡水鱼类的遗传参数的比较

Tab. 7 Comparison of genetic parameters among some cultured marine and freshwater fish

种类 Species	平均多态位点比例/% Percent polymorphic loci	平均杂合度 H_e Average heterozygosity	检测方法 Detecting method	资料来源 Reference
龙鱼 <i>Scleropages formosus</i>	12.7~15.6	0.22~0.26	AFLP	Yue 等 ^[29]
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>		0.109 3	AFLP	张全启等 ^[33]
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	60.92~65.78	0.158 6~1.165 6	AFLP	Liu 等 ^[34]
大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	69.2~70.3		AFLP	王志勇等 ^[15]
紫红笛鲷 <i>Lutjanus argentimaculatus</i>	41.89~55.14		AFLP	张俊彬等 ^[35]
红白锦鲤 <i>Cyprinus carpioid</i>	59.9		AFLP	David 等 ^[36]
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	18.26~100		AFLP	Mickett 等 ^[32]

依据 Slaktin^[39] 基因流理论,当基因流值 $N_m > 1$ 时表明群体间存在基因交流而使遗传结构趋同,反之基因交流受阻而趋异,而表 3 可见,基因流值 (N_m) 为 1.59,似乎表明这 3 种不同体色的群体间相互交配(即基因交流),使三群体遗传结构趋同;而实际上花尾胡椒鲷在人工育种过程中,不同体色群体分化后,都各自独立繁养,不存在基因交流现象。从另一角度而言,群体遗传分化系数 F_{st} 又反映了 86.38% 的遗传变异来自 3 个养殖群体内不同个体间的差异,AMOVA 方差分量百分比表示 89.32% 的变异分布于群体内个体间,这两者的较接近数据表明遗传变异量仍然主要分布于各群体内部而不是群体之间。Benzie^[40] 认为当两个生物群体间的 Nei 遗传距离大于或等于 0.8 时,就可能涉及到两个不同分类群(Taxa),在花尾胡椒鲷养殖群体 3 个群体间两两比对中,就是存在于白色变异群体与正常群体间的遗传距离最大(0.035 4),也远远低于该指标(0.8)。这些又反映了花尾胡椒鲷养殖群体间遗传结构虽出现分化,但相对隔离时间并不长,差异程度并不显著。

感谢:本研究承蒙集美大学水产学院王志勇教授提供 AFLP 分析软件和宝贵意见,在此谨致以衷心感谢。

参考文献:

- [1] 张赐玲. 厚唇石鲈的繁养殖[J]. 养鱼世界(台),1993, 17(5): 59-63.
- [2] 邹记兴,郭国民. 广东主要海水养殖鱼类繁养殖的现状和展望[J]. 海洋湖沼通报,2002,4: 83-89.
- [3] 朱元鼎. 福建鱼类志(下卷)[M]. 福州: 福建科技出版社, 1985: 199-201.
- [4] 谢仰杰,翁朝红,管延华,等. 温度对花尾胡椒鲷(*Plectorhinchus cinctus*) 胚胎发育的影响[J]. 集美大学学报: 自然科学版,2001,6(2): 138-143.
- [5] 蔡克瑕,陈品健,王重刚,等. 饵料对花尾胡椒鲷仔鱼消化酶的影响[J]. 海洋学报,2000,22(2): 142-145.
- [6] 曾明江,胡家财,王传军,等. 花尾胡椒鲷人工繁殖及池塘育苗技术研究[J]. 海洋科学,1999, (6): 18-21.
- [7] 曹伏君,李长玲,刘楚吾,等. 花尾胡椒鲷染色体组型分析[J]. 海洋通报,2001,20(2): 40-43.
- [8] 曹伏君,刘楚吾. 花尾胡椒鲷与胡椒鲷 5 种同工酶的比较研究[J]. 海洋科学,2004,28(1): 23-26.
- [9] 丁少雄,王军,苏永全,等. 花尾胡椒鲷养殖群体遗传多样性的等位酶研究[J]. 台湾海峡,2001,20(2): 224-227.
- [10] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. Aquaculture,2004, 238: 1-37.
- [11] Rubinstein A L, Lee D, Luo R, et al. Genes dependent on zebrafish cyclops function identified by AFLP differential gene expression screen[J]. Genesis,2000, 26: 86-97.
- [12] Felip A, Martinez G, Piferrer F, et al. AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiogynogenetic sea bass *Dicentrarchus labrax* L [J]. Mar Biotechnol,2000,2: 301-306.

- [13] Alberston R C, Markert J A, Danley P D, et al. Phylogeny of rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5 107-5 110.
- [14] 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 (2): 687-694.
- [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] 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.
- [17] Vos P, Hogers M, Reijmans, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23 (21): 4 407-4 414.
- [18] 王志勇, 柯才焯, 王艺磊, 等. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖几种鲷的亲缘关系 [C]// 第一届海洋生物高科技论坛论文集 (上), 2003: 83-89.
- [19] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478-484.
- [20] Nei M. Genetic distance between populations [J]. *Am Nat*, 1972, 106: 283-292.
- [21] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [22] Miller M P. Tools for population genetics analysis (TFPGA), version 1.3: A Windows™ program for the analysis of allozyme and population genetic data [Z]. Available at <http://www.marksgeneticssoftware.net/tfpga.htm>
- [23] Lynch M, Milligan B G. Analysis of population genetic-structure with RAPD markers [J]. *Mol Ecol*, 1994, 3: 91-99.
- [24] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, 38: 1 358-1 370.
- [25] Frankham R, Ballou J D, Brisco D A. Introduction to conservation genetics [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 113.
- [26] Excoffier L G, Laval, Schneider S. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47-50.
- [27] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefing in Bioinformatics*, 2004, 5 (2): 150-163.
- [28] 杨发群, 周秋白, 张燕萍, 等. 鄱阳湖地区 3 种体色黄鳝酯酶同工酶的遗传差异分析 [J]. *经济动物学报*, 2005, 9 (2): 110-113.
- [29] Yue G H, Li Y, Lim L C, et al. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites [J]. *Aquaculture*, 2004, 237, 89-102.
- [30] Kai Y, Nakayama K, Nakabo T. Genetic difference among three colour morphotypes of the black rockfish, *Sebastes inermis*, inferred from mtDNA and AFLP analyses [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11 (12): 2 591-2 598.
- [31] Richards C, Lekberg P L. Temporal changes in allele frequencies and a population's history of severe bottlenecks [J]. *Conserv Biol*, 1996, 10: 832-839.
- [32] Mickett K, Morton C, Feng J, et al. Assessing diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers [J]. *Aquaculture*, 2003, 228: 91-105.
- [33] 张全启, 徐晓斐, 齐洁, 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.
- [34] 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]. *Bioch System Ecol*, 2005, 33 (10): 993-1 005.
- [35] 张俊彬, 黄良民. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *热带海洋学报*, 2004, 23 (5): 50-55.
- [36] David L, Rajasejaram P, Fang J, et al. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266: 353-362.
- [37] Aliah R S, Sato S, Taniguchi N. An evaluation of genetic variability of Nishikigoi, *Cyprinus carpio*, stock from Niigata Prefecture based on microsatellite DNA markers [J]. *Suisanzoshoku*, 2000, 48: 25-31.
- [38] Palumbi S R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1994, 25: 547-572.
- [39] Slaktin M. Gene flow in natural populations [J]. *Annual Review Ecol System*, 1985, 16: 393-430.
- [40] Benzie J A H. Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography [C]// *Biogeography and geological evolution of SE Asia*. The Netherlands: Backbuys Publishers, 1998: 197-209.

Genetic variation in three farmed *Plectorhinchus cinctus* stocks with various body color using AFLP analysis

LIU Wei-bin¹, ZENG Zhi-nan¹, WANG De-xiang², LIU Bo¹, KE Cai-huan²

(1. Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012, China; 2. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Yellow-spotted grunt *Plectorhinchus cinctus* is a commercially important marine fish cultured in both southeast coast and Taiwan Province of China. At present, the technology on mass seed production and grow-out in a large scale are well established for this species in these areas. During the period of artificial breeding, the stock of morphs with white body and black eyes appeared in normal stock first, and then grey-morph stock differentiated from white stock.

In order to assess genetic variation in these different *Plectorhinchus cinctus* stocks with different body color, to investigate their genetic structure, to evaluate the impact of artificial breeding on their genetic diversity and provide a baseline for further study of genetic breeding and population evolution as well, a total of 90 yellow-spotted grunt were collected from three different localities in both Fujian and Guangdong Provinces in 2004. Among them, 12 randomly sampled fish from each stock were used for genomic DNA isolation, and then the amplified fragment length polymorphic (AFLP) technique was employed to analyze genomic DNA polymorphism.

The results showed that a total of 370 DNA amplification bands ranging from 100 to 900 bp were produced using 6 pairs of primer combinations selected for the three stocks, including *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAG, *EcoRI*-ACC/*MseI*-CTC, *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAC, *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTC, *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAT and *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAC, of which 183 were polymorphic and the proportion of polymorphic loci was 49.5%. The amplified bands ranged from 51 to 57 with an average of 61.3 for each primer combination, and the detecting rate of each primer varied from 39.4% to 56.5%. These 6 primer combinations yielded 353 bands, 317 bands and 327 bands, respectively, with 146, 115 and 112 polymorphic loci for normal, white morph and grey morph stocks. Percent polymorphic loci of 41.4%, 36.3% and 34.3% and average heterozygosity of 0.114 5, 0.088 7 and 0.083 7 were determined in normal stock, white morph stock and grey morph stock respectively, which clearly showed the trend in the reduction of genetic diversity in morph stocks in comparisons with normal stock. The maximum genetic distance (0.035 4) was also detected between normal and white morph stocks with minimum genetic coefficient (0.965 2). At the same time, genetic division coefficient F_{st} (0.136 2) and percent variance component of AMOVA (10.68%) also indicated that some genetic differentiation occurred in these three stocks. There existed a certain genetic structure differentiation among them, but there was still more genetic divergence within the stocks than that between the stocks. Either NJ cluster analysis or UPGMA cluster analysis classified normal stock and grey stock into the same category, and white stock was another cluster. It is concluded that genetic divergence is higher in normal stock than that in white or grey stock; the former has rich genetic diversity and grey stock possesses low genetic divergence and diversity compared with the two others. Selective breeding in terms of body color as a specifically phenotypic trait has some impacts on genetic variation of farmed stocks of *P. cinctus*. However, due to a comparatively short time of isolation in each stock, there has been no significant genetic difference between them so far ($P > 0.05$). [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 38–46]

Key words: *Plectorhinchus cinctus*; farmed stocks; color morph; AFLP; genetic variation

Corresponding author: ZENG Zhi-nan. E-mail: xmznn@sina.com