

鳊属5种鱼类微卫星遗传多样性分析

赵程 梁旭方 田昌绪 杨敏 窦亚琪 郭稳杰 宋易

华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室/湖北省淡水渔业协同创新中心, 武汉 430070

摘要 利用8对已发表的翘嘴鳊微卫星引物,对5种鳊属鱼类翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊、波纹鳊和暗鳊共147个个体进行跨种扩增和遗传多样性的研究。结果发现,8个微卫星标记除位点HW8在波纹鳊中无多态性外,其他位点在5种鳊属鱼类中都具有较高的多态性。每个位点等位基因数为4~8个不等,平均等位基因数为6.13;在5个物种中分析的平均有效等位基因数为3.58,平均观测和期望杂合度分别为0.75和0.59,平均多态性信息含量0.51,为高度多态,表明鳊属鱼类物种的遗传多样性比较丰富。采用Nei's遗传距离和遗传相似性系数分析5种鳊属鱼类系统发育关系,并构建UPGMA聚类图,结果显示翘嘴鳊和大眼鳊、斑鳊和波纹鳊分别有较近的亲缘关系,斑鳊和暗鳊亲缘关系最远。

关键词 鳊属;微卫星标记;多态性;遗传多样性;系统发育关系

中图分类号 Q953+.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0076-05

鳊属(*Siniperca*)鱼类隶属于鲈形目(Perciformes),鳊亚科(Siniperinae),是一类淡水底栖凶猛性鱼类,包括翘嘴鳊(*S. chuatsi*)、大眼鳊(*S. kneri*)、斑鳊(*S. scherzeri*)、波纹鳊(*S. undulata*)和暗鳊(*S. obscura*)等5个物种,主要分布范围有我国东部、俄罗斯远东地区、朝鲜半岛,日本和越南等亦有分布^[1]。鳊类因其肉质纯白细嫩,厚实无刺,味道鲜美可口,营养价值丰富等特点而深受人们的青睐,其中翘嘴鳊、大眼鳊和斑鳊已成为人工养殖的主要名贵经济鱼类。目前对鳊属鱼类遗传背景的研究主要集中在翘嘴鳊和斑鳊,且多见于RAPD技术,如杨受保等^[2]采用RAPD技术对长江水系3个水域的翘嘴鳊群体的基因组进行了检测和遗传信息的分析;方展强等^[3]对翘嘴鳊野生群体和养殖群体的遗传多样性进行了RAPD分析;杨星等^[4]对斑鳊、翘嘴鳊及其杂交鳊进行RAPD鉴定并分析了斑鳊种内遗传多样性。但RAPD技术因其扩增结果重复性差,无法鉴别纯合子与杂合子等缺点,导致其不能满足更进一步的研究需要。

近年来,微卫星标记(microsatellite marker)以其数量多、分布广泛且均匀、共显性遗传、多态性高,

以及引物在种属间具有一定的通用性等特点^[5],被大量应用于水产动物的群体遗传结构分析、遗传多样性分析等研究^[6-8]。梅秋兰等^[9]利用20对微卫星引物对鳊原种群体和养殖群体进行遗传多样性分析;朱滔等^[10]从翘嘴鳊的EST文库中开发并筛选出22对具有多态性的微卫星标记对翘嘴鳊3个野生群体进行了遗传多样性分析;Cao等^[11]利用微卫星标记对长江、鸭绿江、珠江及钱塘江流域的野生斑鳊资源进行了遗传多样性分析。然而,在鳊属鱼类的相关研究中,由于选用的微卫星标记不一样,且缺乏相同类型的微卫星标记资源,目前还无法基于微卫星标记对鳊属鱼类进行准确的遗传多样性和系统发育关系分析。

因此,本研究利用在翘嘴鳊中已发表的微卫星引物,在5种鳊属鱼类中进行PCR跨种扩增,以期得到适用于该属鱼类种群遗传学研究的微卫星标记;利用微卫星标记对5种鳊属鱼类的遗传多样性及系统发育关系等进行分析,以期为进一步鳊类野生资源的多样性检测和评估、种群遗传学研究和进化关系分析等提供理论支持,也为鳊类优良种质资源的合理保护和发掘利用奠定基础。

收稿日期: 2015-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272641,31172420);珠江流域高产精养池塘健康养殖技术与示范项目(2012BAD25B04)

赵程, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传与育种. E-mail: zhaocheng130754@163.com

通信作者: 梁旭方, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类遗传与育种. E-mail: xufang_liang@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 样品的采集和 DNA 的提取

随机挑选已采集的野生鳊样本: 翘嘴鳊 30 尾, 来自湖南怀化和常德; 斑鳊 30 尾, 来自辽宁凤城和湖北崇阳; 大眼鳊 30 尾, 来自湖南怀化和常德; 波纹鳊 29 尾, 来自浙江衢州和江西余干; 暗鳊 28 尾, 来自湖南怀化。

所有样品剪取胸鳍少许, 于 95% 无水乙醇中固

定, 按照 TIANamp Genomic DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)的说明提示获得样品的基因组 DNA。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白酶标仪检测所提取 DNA 的质量和浓度, -20 °C 下保存备用。

1.2 引物来源

随机挑选已在翘嘴鳊群体中成功扩增的微卫星序列^[12], 合成相应的微卫星引物, 共 8 对, 名称和退火温度等具体见表 1。

表 1 8 个微卫星标记及等位基因数

Table 1 Characterization of eight microsatellite markers and the observed number of alleles

名称 Name	登录号 GenBank accession No.	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	长度范围/ bp Size range	退火温度/°C Annealing temperature	等位基因数 Observed number of alleles
HW1	JQ686894	F: TGTAAGTG TACAAAGAACTTTTCGC R: AGACAATGTAAAAGTTGGTTCAGC	121~178	56.0	7
HW2	JQ686897	F: TTTCTCCTCAGTCACAGCAGA R: TGGTTGCTTCAGATCAGTGCCA	156~217	56.0	6
HW3	JQ686898	F: GAATAGCAAATGTCTCGCCG R: GCGGAAAGCCATTCTCAGGA	181~225	56.0	8
HW4	JQ804735	F: GTCTGGTTTCTGGTCTTGCTT R: GCACCATTCGTTGCTGAGAC	140~286	56.0	5
HW5	JQ804736	F: GCTTGAGATGTACGAGAGAGAGA R: AGGATTAGAGGTGTTTCAGCC	150~229	54.5	5
HW6	JQ804737	F: ATCAGCTCAACCCCTCTGCAT R: GCATGGATGCCAGCGTGAG	130~178	56.0	4
HW7	JQ804749	F: GACTGACTGTGCCCTCTGTG R: ATGTGCCAAGCCTCACCAAT	140~271	56.0	8
HW8	JQ804751	F: AGCTTGCTGAATCTGAATCATCCT R: TGCTCTAATGTGGGCAAAAGTCA	183~271	54.5	6

1.3 PCR 扩增反应的体系和程序

PCR 反应体系的总体积为 12.5 μL, 内含 DNA 0.25 μL, 10 × Taq PCR Buffer(含 Mg²⁺) 1.25 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 0.25 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 0.25 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.125 μL, 去离子水 10.125 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 4 min, 然后按 94 °C 变性 30 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 30 s 进行 30 个循环, 循环结束后再 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和基因分型

PCR 产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测, 10 V/cm 低电压电泳 2 h。电泳结束后银染法显色。用 Alpha Innotech402942 凝胶成像系统扫描记录, 用 Alpha View SA 软件以 DNA Marker(pBR322DNA/Msp I) 作为分子质量参照, 确定每个个体的基因型并估计等位基因大小。

1.5 数据处理与分析

根据 PCR 扩增片段的变异范围和特征, 对由扩增条带的表现型获得的基因型, 利用 Popgene 32 (Version 1.31) 和数据转换软件进行统计分析。统计的指标主要有各位点的等位基因数、有效等位基因数、观察杂合度、期望杂合度、多态信息含量、标准 Nei' s 遗传距离和遗传相似系数等; 以及由 PHYLIP Version 3.5 软件中的类平均聚类法 UPGMA 和 MEGA5.1 软件等构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 微卫星 PCR 扩增结果

8 个微卫星位点在 5 种鳊属鱼类即翘嘴鳊、斑鳊、大眼鳊、波纹鳊和暗鳊中进行 PCR 跨种扩增, 均能成功得到目的条带。除位点 HW8 在波纹鳊中表现为单态外, 其他位点在 5 种鳊类中都表现为多态。

这些位点在 5 种鳊类中共检测出 49 个等位基因,随引物的不同,检测到的等位基因数分别为 4~8 个不等,平均值为 6.13。引物 HW3 和 HW7 的等位基因数最多,均为 8 个,引物 HW6 的等位基因数最少。其中,位点 HW1 在暗鳊、位点 HW8 在斑鳊和波纹鳊为纯合子,而在其他鳊类中均为杂合子。

2.2 遗传多样性分析

5 种鳊的平均有效等位基因数为 3.58,翘嘴鳊最多为 4.75,大眼鳊、波纹鳊和暗鳊最少,均为 3.00;观察杂合度为 0.66~0.85 之间,平均值为 0.75,期望杂合度为 0.52~0.69,平均值为 0.59,其中波纹鳊最低(0.52),翘嘴鳊最高(0.69)。经计算 5 个物种

的多态信息含量平均为 0.51,其中翘嘴鳊最高(0.63),波纹鳊和暗鳊最低(0.45)(表 2)。

2.3 遗传距离和遗传相似性系数

不同物种间的遗传相似性系数在 0.309 6 到 0.627 8 之间,遗传距离在 0.465 5 到 1.172 4 之间,5 个物种间存在一定的遗传变异。其中,物种间遗传距离最小而相似性系数最大的是斑鳊和波纹鳊,分别为 0.465 5 和 0.627 8,说明这 2 种鱼的亲缘关系较近;斑鳊和暗鳊之间的遗传距离最大(1.172 4),其遗传相似性系数最小(0.309 6),说明这 2 个物种间的遗传变异程度最高,亲缘关系最远(表 3)。

表 2 5 种鳊属鱼类群体 8 个微卫星标记基因位点的统计信息

Table 2 The statistic information of 8 microsatellite markers loci in the five species of *Siniperca*

物种 Species	有效等位基因数 Effective numbers of allele	平均观测杂合度 Mean value of observed heterozygosity	平均期望杂合度 Mean value of expected heterozygosity	平均多态信息含量 Average polymorphism information content
翘嘴鳊 <i>S. chuatsi</i>	4.75	0.83	0.69	0.63
大眼鳊 <i>S. kneri</i>	3.00	0.85	0.59	0.49
斑鳊 <i>S. scherzeri</i>	4.13	0.70	0.62	0.55
波纹鳊 <i>S. undulata</i>	3.00	0.66	0.52	0.45
暗鳊 <i>S. obscura</i>	3.00	0.71	0.53	0.45

表 3 Nei's 遗传距离(左下角)和遗传相似性系数(右上角)

Table 3 Nei's genetic distances (above diagonal) and genetic identities (below diagonal)

物种 Species	翘嘴鳊 <i>S. chuatsi</i>	斑鳊 <i>S. scherzeri</i>	波纹鳊 <i>S. undulata</i>	暗鳊 <i>S. obscura</i>	大眼鳊 <i>S. kneri</i>
翘嘴鳊 <i>S. chuatsi</i>	* * * *	0.583 4	0.359 3	0.613 6	0.623 9
斑鳊 <i>S. scherzeri</i>	0.538 9	* * * *	0.627 8	0.309 6	0.374 0
波纹鳊 <i>S. undulata</i>	1.023 7	0.465 5	* * * *	0.326 7	0.498 7
暗鳊 <i>S. obscura</i>	0.488 3	1.172 4	1.118 7	* * * *	0.613 2
大眼鳊 <i>S. kneri</i>	0.471 8	0.983 4	0.695 7	0.489 1	* * * *

根据以上结果构建 5 种鳊的系统发育树(图 1),从图 1 中可看出翘嘴鳊和大眼鳊的亲缘关系最近,并与暗鳊较近,斑鳊与波纹鳊亲缘关系较近。

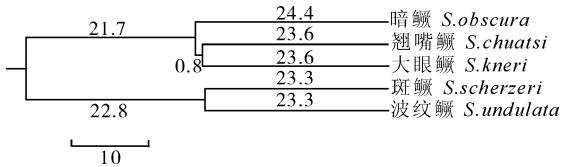


图 1 5 种鳊属鱼类的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA cluster dendrogram of the five species of *Siniperca*

3 讨论

微卫星 DNA 是由 1~6 个碱基组成的简单串联重复序列,其组成结构是位于中心的核心重复序

列(core repeat)及其两边的侧翼序列(flanking region),通常情况下亲缘关系较近的物种间微卫星的侧翼序列具有很高的同源性。因此,利用 GenBank 数据库资源和已经被发表的微卫星位点,通过优化相近物种的微卫星引物 PCR 反应条件,来获得适用于所研究物种的微卫星标记是一条简捷有效的途径^[13]。如用铲鲟(*Scaphirhynchus platorynchus* Rafinesque)微卫星分子标记对中华鲟(*Acipenser sinensis* Gray)进行种间多态性检测获得成功^[14]。本文利用已发表的 8 个翘嘴鳊微卫星标记,对包括翘嘴鳊在内的鳊属其他鱼类,即大眼鳊、斑鳊、波纹鳊和暗鳊共 5 个物种进行 PCR 跨种扩增,结果获得了单一稳定性良好的目标产物。8 对引物共获得 49 个等位基因,等位基因数在 4~8 之间,平均 6.13 个;有效等位基因数在 2.64~6.28 之间,平均每个

位点检测到 3.58 个有效等位基因。根据以上结果,笔者认为基于翘嘴鳊转录组获得的这 8 个微卫星标记能较好地用于鳊属其他鱼类的遗传多样性分析研究。结果也说明鳊属鱼类微卫星侧翼序列在同属内不同种间具有保守性,再次印证了鱼类的微卫星引物在同属其他鱼类具有一定的通用性。

一般用有效等位基因数、杂合度及多态信息含量等指标来衡量遗传标记的多态性程度及其应用价值^[15]。杂合度是群体在多个基因座上的遗传变异的表现,被认为是评价群体的遗传变异的一个最适参数^[16]。本研究中 5 种鳊群体的平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.75 和 0.59,按照哈代温伯格定理,杂合度在随机交配群体中不能大于 0.5,本研究中这 5 种鳊类群体的杂合度均偏高,表明它们的遗传多样性比较丰富,在自然环境中发生近交的可能性不大,含有非常丰富的遗传育种和遗传改良潜力。多态信息含量(PIC)一般用来表示突变位点多态性的高低。PIC<0.25 为低度多态,0.50>PIC>0.25 为中度多态,PIC>0.5 为高度多态^[17]。本研究发现,5 种鳊的 PIC 值平均为 0.51,大于 0.5,仅波纹鳊和暗鳊为 0.45,说明 5 个物种间遗传变异较大,信息含量较高,属于中度及高度多态,蕴含着较大的物种进化潜力。

理论上来说,微卫星引物在进化分类系统越接近的物种间的通用性也更高^[18]。群体间的遗传关系一般以两两群体间基于等位基因频率等指标获得的遗传距离来衡量,而以微卫星标记得到的群体间遗传距离被认为是比较真实可信的^[19]。本文采用 Nei's 遗传距离和遗传相似性系数及构建 UPGMA 聚类图分析 5 种鳊的系统发育关系,结果显示,翘嘴鳊与大眼鳊亲缘关系较近,并与暗鳊聚为一支,斑鳊与波纹鳊亲缘关系较近并聚为另一支,斑鳊和暗鳊亲缘关系最远,与赵金良等^[20]基于线粒体细胞色素 b 基因序列对东亚鳊类系统发育关系的研究结果基本一致。

本研究结果证明,利用翘嘴鳊微卫星引物对同属其他 4 种鳊进行 PCR 跨种扩增的方法,来获得适用于该属鱼类种群遗传性研究的微卫星标记是可行的。同时,利用微卫星标记对 5 种鳊类进行遗传多样性及系统发育分析的结果也比较可靠,这些鳊类的遗传多样性程度较高,种间遗传变异较大,这可能与它们适应不同的生存环境有关。由于地域差异比较大,且在自然条件下近交和外来压力较小,5 种鳊

类均蕴涵着比较大的进化潜能和较为丰富的遗传育种和遗传改良潜力。随着鳊类野生资源保护和可持续开发利用的力度加大,以微卫星标记手段的不同鳊类的遗传多样性以及系统进化关系研究,对进一步鳊类野生资源的多样性检测和评估、种群遗传学研究和进化关系分析等研究提供了一定的理论支持,同时对鳊类优良种质资源的合理保护和发掘利用具有重大意义。

参 考 文 献

- [1] 李思忠. 鳊亚科鱼类地理分布的研究[J]. 动物学杂志, 1991, 26(4): 40-44.
- [2] 杨受保, 祖国掌, 程久发. 鳊鱼遗传多样性的 RAPD 指纹分析[J]. 水产养殖, 2003, 24(4): 33-35.
- [3] 方展强, 陈军, 郑文彪, 等. 鳊野生群体与养殖群体的 RAPD 分析[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(1): 16-19.
- [4] 杨星, 杨军峰, 汤明亮, 等. 斑鳊种内遗传多态性以及翘嘴鳊的分子鉴别[J]. 水生生物学报, 2007, 31(6): 891-895.
- [5] 徐莉, 赵佳仿. 微卫星 DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 714-722.
- [6] FERGUSON A. Molecular genetics in fisheries: current and future perspective [J]. Reviews in Fish Biology Fisheries, 1994, 4: 379-383.
- [7] KOCHER T D, LEE W J, SOBOLEWSKA H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish: the tilapia or cochromis miloticus [J]. Genetics, 1998, 148(3): 1225-1232.
- [8] DAEMEN E. Analysis of the genetics structure of European eel using microsatellite DNA and mtDNA markers [J]. Marine Biology, 2001, 139: 755-764.
- [9] 梅秋兰, 刘臻, 张学文, 等. 鳊原种群体和养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 266-272.
- [10] 朱滔, 梁旭方, 彭敏燕, 等. 翘嘴鳊 EST-SSR 标记的开发及 3 个群体遗传多态性分析[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2013, 34(3): 347-352.
- [11] CAO L, LIANG X F, QU C M, et al. Genetic population structure in *Siniperca scherzeri* (Perciformes: Siniperca) in China inferred from mitochondrial DNA sequences and microsatellite loci [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 51: 160-170.
- [12] HUANG W, LIANG X F, QU C M, et al. Development and characterization of novel polymorphic microsatellite loci in *Siniperca scherzeri* Steindachner and *Siniperca chuatsi* (Basilevsky) [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 40: 751-756.
- [13] 鲁双庆, 刘臻, 刘红玉, 等. 鲫鱼 4 群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 371-376.

- [14] 邵昭君,赵娜,朱滨,等.铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究[J].水生生物学报,2002,26(6):577-584.
- [15] 吴旭东,连总强,侯玉霞,等.大口鲶微卫星标记在三个鲶形目鱼类种群间适用性研究[J].水生生物学报,2011,35(4):638-645.
- [16] 于冬梅,马海涛,孙效文.三个虹鳟养殖群体遗传结构的微卫星分析[J].动物学杂志,2007,42(4):8-14.
- [17] NEI M. Genetic distance between populations [J]. The American Naturalist, 1972, 106: 223- 229.
- [18] 全迎春,梁利群,孙效文,等.斑马鱼微卫星分子标记检测鲤鱼种间多态性[J].中国水产科学,2006,13(2):300-304.
- [19] 林能锋,苏永全,丁少雄,等.大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究[J].中国水产科学,2008,15(2):237- 343.
- [20] 赵金良,李思发,蔡完其,等.基于细胞色素 b 基因序列的东亚鳊类系统发育关系[J].动物学报,2006,52(4):676-680.

Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships of five *Siniperca* species based on microsatellite markers

ZHAO Cheng LIANG Xu-fang TIAN Chang-xu YANG Min
DOU Ya-qi GUO Wen-jie SONG Yi

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture/
Freshwater Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract By using eight microsatellite primer pairs, cross-species amplification and genetic diversity analysis were carried out from a total of 147 individuals among five species of *Siniperca*, namely *S. chuatsi*, *S. kneri*, *S. scherzeri*, *S. undulata* and *S. obscura*. The results showed that except for loci HW8 of *S. undulate*, eight microsatellite loci in the five species of *Siniperca* were highly polymorphic. The numbers of alleles per locus ranged from 4 to 8, and the mean allele numbers was 6.13. The average effective number of alleles of the five species was 3.58, with the average observed and expected heterozygosity being 0.75 and 0.59, respectively. The average polymorphism information content was 0.51. All these data showed that the eight microsatellite markers had high sensibility, and could be used for species identification and analysis in the sinipercline fishes. Using Nei's genetic distance and genetic similarity coefficient, the UPGMA clustering showed that the genetic relationship between *S. chuatsi* and *S. kneri*, *S. scherzeri* and *S. undulata* were relatively closer, while genetic relationship between *S. scherzeri* and *S. obscura* was the furthest.

Key words *Siniperca*; microsatellite marker; polymorphism; genetic diversity; phylogenetic relationships

(责任编辑:边书京)