

文章编号: 1004 - 7271(2007)02 - 0097 - 06

不同倍性团头鲂群体遗传变异的初步分析

唐首杰, 李思发

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:从鲤的微卫星 DNA 标记中筛选 4 对有效引物, 进行不同倍性团头鲂遗传变异的微卫星 DNA 分析。结果表明: (1) 4 对引物中有 2 对能在不同倍性团头鲂五群体中探测到多态性, 其等位基因数为 4 ~ 6 个, 大小在 131 ~ 307 bp 之间。发现两个等位基因 (MFW19 - 175 和 MFW19 - 256) 可作为异源 3n 特异的微卫星 DNA 标记。(2) 不同倍性团头鲂五群体内的 Shannon 多样性指数为 0.056 2 ~ 0.288 7, Nei's 基因多样性指数为 0.031 5 ~ 0.196 9, 平均遗传距离为 0.039 5 ~ 0.154 2, 不同倍性团头鲂群体存在较大的遗传变异。(3) 反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n - F₁ 群体的 Shannon 多样性指数和 Nei's 基因多样性指数均显著地高于 2n 群体 ($P < 0.05$)。(4) 分子方差分析和聚类分析的结果表明: 五群体分子系统树分成明显的两支, 同源 4n - F₁、正交 3n、反交 3n 和异源 3n 为一支, 2n 为另一支。

关键词:团头鲂; 倍性; 微卫星; 遗传变异

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Preliminary analysis of genetic variation of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) populations with different ploidy levels

TANG Shou-jie, LI Si-fa

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The molecular genetic variation of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) with different ploidy levels was investigated using 4 pairs of microsatellite primers. The results showed that: (1) In 4 primers, only 2 primers were effective, and 4 - 6 alleles were detected by each primer, and the size of alleles ranged from 131 bp to 307 bp. Meanwhile, two alleles (MFW19 - 175 and MFW19 - 256) were found as specific microsatellite DNA markers to distinguish allo - 3n from the other four populations. (2) Shannon's diversity index, Nei's gene diversity index and the average genetic distance within each population were 0.056 2 - 0.288 7, 0.031 5 - 0.196 9 and 0.039 5 - 0.154 2 respectively, which was a good indication of high genetic variation in five populations of blunt snout bream with different ploidy levels. (3) Both Shannon's diversity index and Nei's gene diversity index from Negative 3n hybrid, Allo - 3n, Positive 3n hybrid and Auto-4n-F₁ were significantly higher than those of 2n population ($P < 0.05$). (4) Analysis of molecular

收稿日期: 2006-06-20

基金项目: 上海市农委科技兴农重点攻关项目 (03 - 143)

作者简介: 唐首杰 (1981 -), 男, 江苏常州人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。Tel: 021 - 65710062,

E-mail: tangshoujie@yahoo.com.cn

通讯作者: 李思发, Tel: 021 - 65710333, E-mail: sfli@shfu.edu.cn

variance (AMOVA) and cluster analysis indicated that there was significant divergence among five populations of blunt snout bream with different ploidy levels. The phylogenetic tree has two independent evolutionary branches. Negative 3n hybrid, Allo-3n, Positive 3n hybrid and Auto-4n-F₁ shared a common group, while 2n was another independent evolutionary branch.

Key words: blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*); ploidy; microsatellite; genetic variation

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 系草食性鱼类, 2004 年的养殖产量达 51 万吨, 为我国重要养殖种类。上海水产大学通过 15 年的系统选育, 育成了团头鲂良种“浦江 1 号”^[1,2], 并在此基础上, 自 2000 年开始, 通过大量人工诱导和快速筛选, 建立了一个雌雄均可育的团头鲂四倍体奠基群体^[3]。微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 又称为简单序列重复 (Simple Sequence Repeats, SSR), 是指以 1~6 个核苷酸为基本重复单位的串联重复序列, 其长度大多在 100 bp 以内。微卫星序列广泛存在于各类真核生物基因组中, 具有很高的多态性, 而且遵循孟德尔共显性遗传规律, 在分析鱼类种群遗传结构^[4-6]、亲缘关系鉴定与家系分析^[7-9], 以及基因图谱构建^[10,11]等研究中得到了广泛的应用。我们使用微卫星 DNA 标记来探讨不同倍性团头鲂的遗传差异, 以期对团头鲂种质的进一步创新提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所有材料均取自上海水产大学南汇水产动物种质资源试验站。团头鲂人工同源四倍体自繁 F₁ (4n - F₁) 为 4n ♀ × 4n ♂ 后代; 正交同源三倍体 (正交 3n) 为 4n ♀ × 2n ♂ 后代; 反交同源三倍体 (反交 3n) 为 2n ♀ × 4n ♂ 后代; 异源 3n 为团头鲂 2n ♀ × (团头鲂 ♀ × 三角鲂 ♂) 异源 4n ♂ 后代; 二倍体对照 (2n) 为团头鲂“浦江 1 号”。共 5 种倍性的鱼。下文分别用“同源 4n - F₁”、“正交 3n”、“反交 3n”、“异源 3n”、“2n”表示。

对所有实验鱼进行尾静脉抽血 (< 5 μL), 采用 Coulter-Counter 颗粒分析仪 (Beckman-Coulter Company, USA) 进行倍体检测^[12], 确定实验鱼的倍性后, 剪取鳍条, 95% 酒精固定。异源 3n 群体取样 9 尾, 其余各倍性群体随机取样 10 尾, 共 49 尾进行微卫星 DNA 分析。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 提取采用常规的“酚-氯仿”方法进行^[13]。

1.3 微卫星引物的选择与来源

由于微卫星座位两侧的引物在亲缘关系相近物种之间具有很高的保守性, 本研究所用的微卫星引物来自 Crooijmans 等^[14]从鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 中分离出来的包含 CA 重复单元的 4 个微卫星 DNA 标记。4 对微卫星引物分别为 MFW1, MFW2, MFW19, MFW20。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 PCR 扩增和检测

PCR 的扩增参照 Crooijmans 等^[14]的方法, 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用 Sambrook 等^[13]的银染法染色。用 Syngene 凝胶成像分析系统进行扫描摄像, 并用 GeneTools 软件对每对微卫星引物扩增的等位基因的分子量大小进行估算。

1.5 PCR 扩增产物的序列鉴定

采用 Sambrook 等^[13]的压碎与浸泡法从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段。然后以回收的 DNA 片段为模板, 进行二次 PCR 扩增, 最后对扩增产物进行纯化。纯化后的产物用 pGEM[®]-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5α 上, PCR 法鉴定后在 ABI3700 测序仪上测序。

1.6 数据处理和分析

测序的序列结果用 BioEdit 软件^[15]进行编辑,再用 SSRHunter 1.3 软件搜索目的基因序列中是否含有微卫星重复序列。用 POPGENE 1.31 软件^[16]计算香农多样性指数、Nei's 基因多样性指数和 Nei's 标准遗传距离。用 Arlequin 3.01 软件^[17]进行分子方差分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)。根据群体间的遗传距离,用 MEGA 3.0 软件包^[18]中的“NJ”和“UPGMA”程序对五种倍性团头鲂群体进行聚类分析。

2 结果

2.1 不同倍性团头鲂微卫星位点的扩增特点

4 对引物均能在团头鲂基因组上得到扩增产物,但引物 MFW20 的扩增结果无多态性,MFW2 虽然可以得到多态性的扩增产物,但是其等位基因的测序结果中不含微卫星重复序列。其余 2 对微卫星引物(MFW1, MFW19)所扩增出的等位基因均含有 CA 重复单元,本研究中只使用这两对引物用于不同倍性团头鲂五群体的遗传结构分析。

2 对微卫星引物在不同倍性团头鲂群体中探测到的等位基因数为 4~6 个,大小在 131~307 bp 之间。引物 MFW1 在 2n 群体中检测到 5 个大小分别为 138 bp、159 bp、186 bp、268 bp 和 307 bp 的等位基因,在其余四群体中检测到 6 个大小分别为 131 bp、138 bp、159 bp、186 bp、268 bp 和 307 bp 的等位基因。MFW19 在 2n 群体、4n 群体、正交 3n 群体和反交 3n 群体中均检测到 4 个大小分别为 186 bp、193 bp、221 bp 和 228 bp 的等位基因,在异源 3n 群体中检测到 6 个大小分别为 175 bp、186 bp、193 bp、221 bp、228 bp 和 256 bp 的等位基因,个体之间有明显的多态性。

2.2 异源 3n 团头鲂特有的微卫星 DNA 标记

引物 MFW19 在异源 3n 群体中扩增的 175 bp 和 256 bp 的等位基因(分别命名为 MFW19-175 和 MFW19-256),不仅是原始母本所没有的,而且也是其余群体所没有的,可以作为异源 3n 群体特有的微卫星 DNA 标记(图 1)。本研究对 MFW19-175 片段单独进行克隆和测序,发现该片段中含有复合的微卫星,其重复序列为(TC)₈(AC)₁₄。这两个等位基因可能来源于其原始父本(团头鲂♀×三角鲂♂)异源 4n。

2.3 不同倍性团头鲂的遗传变异水平

2.3.1 遗传多样性指数

不同倍性团头鲂的群体内 Shannon 多样性指数和 Nei's 基因多样性指数列于表 1。两指数均表现为反交 3n 群体最高,2n 群体最低,大小顺序均为:反交 3n > 异源 3n > 正交 3n > 同源 4n - F₁ > 2n。其中反交 3n、异源 3n、正交 3n 和同源 4n - F₁ 群体的 Shannon 多样性指数和 Nei's 基因多样性指数均显著地大于 2n 群体($P < 0.05$)。

2.3.2 遗传相似度和遗传距离

不同倍性团头鲂的群体内和群体间遗传相似度和遗传距离列于表 2。群体内的遗传相似度大小顺序依次为:同源 4n - F₁ > 2n > 正交 3n > 反交 3n > 异源 3n。三倍体(异源 3n、反交 3n 和正交 3n)的群体内遗传距离显著大于 2n 和同源 4n - F₁ 群体($P < 0.05$)。

2n 群体和正交 3n 群体之间的遗传相似度最小(0.658 2),遗传距离最大(0.418 3)。反交 3n 群体和同源 4n - F₁ 群体间的遗传相似度最大(0.948 6),遗传距离最小(0.052 8)。

2.3.3 分子方差分析(AMOVA)

对不同倍性团头鲂群体微卫星标记分析的遗传变异进行分子方差分析(表 3)表明,群体间的方差组分占总变异的 53.87%,群体内的方差组分占总变异的 46.13%,五群体间总的遗传分化指数(F_{st})为 0.538 65,差异显著($P < 0.05$),表明不同倍性团头鲂群体间出现显著的遗传分化。

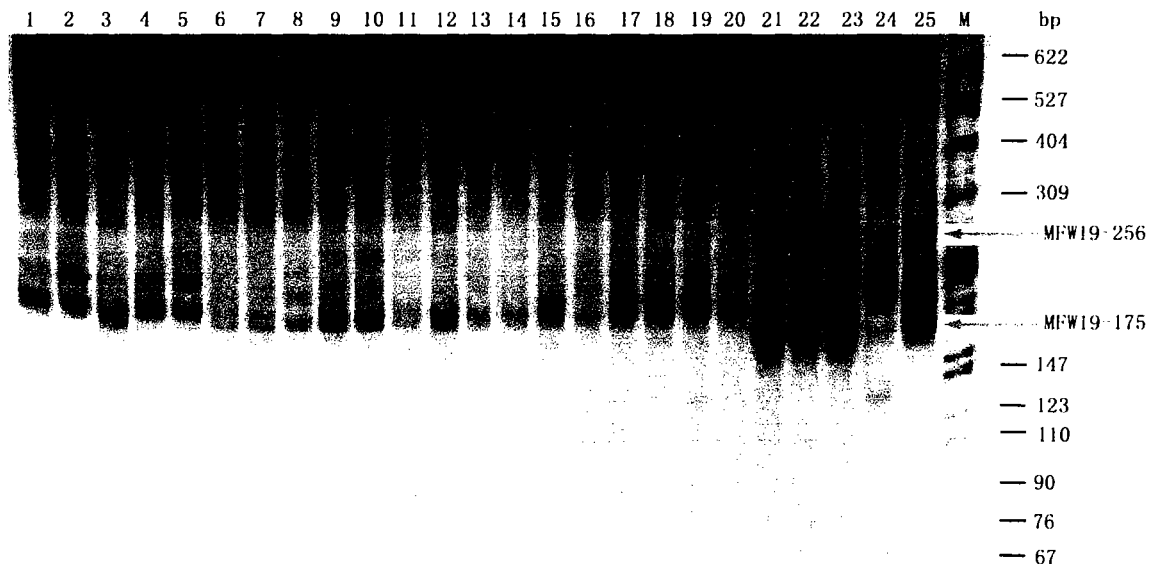


图1 微卫星引物 MFW19 在不同倍性团头鲂五群体中的电泳结果
 Fig.1 The electrophoresis results of microsatellite primer MFW19 in five populations of blunt snout bream with different ploidy level
 箭头示异源 3n 特异的微卫星 DNA 标记(MFW19-175 和 MFW19-256)
 1-5:2n; 6-10:同源 4n-F₁; 11-15:正交 3n; 16-20:反交 3n;
 21-25:异源 3n; M:pBR322 DNA/MspI

表1 不同倍性团头鲂群体的 Shannon 多样性指数和 Nei's 基因多样性指数 (Mean ± SD)
 Tab.1 Shannon's diversity index and Nei's gene diversity index in five populations of blunt snout bream with different ploidy levels (Mean ± SD)

	2n	同源 4n-F ₁	正交 3n	反交 3n	异源 3n
Shannon 多样性指数	0.056 2 ± 0.131 2	0.114 6 ± 0.267 6*	0.187 8 ± 0.288 9*	0.288 7 ± 0.313 7*	0.283 8 ± 0.308 6*
Nei's 基因多样性指数	0.031 5 ± 0.073 5	0.082 4 ± 0.192 5*	0.127 5 ± 0.200 8*	0.196 9 ± 0.218 9*	0.192 3 ± 0.214 7*

* 差异显著 P < 0.05

表2 不同倍性团头鲂五群体内和群体间的遗传相似性(右上角)和遗传距离(左下角)
 Tab.2 The genetic identities (right-upper diagonal) and genetic distances (left-lower diagonal) within populations and between populations of blunt snout bream with different ploidy levels

群体	2n	同源 4n-F ₁	正交 3n	反交 3n	异源 3n
2n	0.955 6 0.044 4	0.735 2	0.658 2	0.732 3	0.703 5
同源 4n-F ₁	0.307 6	0.960 5 0.039 5	0.916 2	0.948 6	0.747 8
正交 3n	0.418 3	0.087 5	0.920 0 0.080 0	0.936 9	0.836 2
反交 3n	0.311 6	0.052 8	0.065 2	0.876 4 0.123 6	0.837 7
异源 3n	0.351 6	0.290 6	0.178 9	0.177 1	0.845 8 0.154 2

表3 不同倍性团头鲂群体间遗传差异的分子方差分析(AMOVA)
 Tab.3 Analysis of molecular variance (AMOVA) among five populations of blunt snout bream with different ploidy levels

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例(%)
群体间	4	37.839	0.888 05	53.87
群体内	44	33.467	0.760 61	46.13
总变异	48	71.306	1.648 66	100

遗传分化指数 F_{st} = 0.538 65

2.3.4 聚类分析

用 MEGA 3.0 软件中的 UPGMA 法和 NJ 法构建的不同倍性团头鲂五群体的分子系统树基本一致(图 2)。聚类结果显示,团头鲂五群体明显分成两支,同源 $4n - F_1$ 、正交 $3n$ 、反交 $3n$ 和异源 $3n$ 为一支, $2n$ 为另一支。该结果表明经过染色体加倍和倍间杂交,增加了不同等位基因交换和组合的频率,而且,同源 $4n$ 在形成 $2n$ 配子过程中可能存在较频繁的连锁互换,以及四倍体鱼在传代过程中的等位基因自由组合度增加,也可能导致基因频率和基因型发生一些改变。这使团头鲂多倍体群体(同源 $4n - F_1$ 、正交 $3n$ 、反交 $3n$ 、异源 $3n$)与二倍体群体聚为明显的两支。

3 讨论

3.1 鲤微卫星引物对团头鲂基因组分析的适用性

微卫星侧翼序列在物种进化过程中具有相对保守性,使得微卫星标记在亲缘关系相对较近的物种间具有引物通用性,这一点,已为许多学者证实并利用^[19-24]。

目前,各种 DNA 数据库中尚无团头鲂的微卫星资料可资利用。而鲤和团头鲂,同为鲤科鱼类,分属不同亚科。鲤为鲤亚科(Cyprininae)鲤属(Cyprinus),团头鲂为鲃亚科(Culterinae)鲃属(Megalobrama),两者有较近的亲缘关系^[25],其微卫星侧翼序列应该有一定的同源性。从初步筛选的结果来看,尽管所用样本数目不多,但在本研究所选用的 4 对鲤微卫星引物中,仍有 2 对(占 50%)引物在不同倍性团头鲂基因组中扩增出相应的多态性条带。与邹曙明^[26]的结果相似。表明鲤的微卫星引物经过筛选后,有一些可以用于团头鲂基因组的研究。扩大引物筛选的范围,肯定能找到更多的可用于团头鲂基因组分析的鲤微卫星引物。

3.2 关于不同倍性团头鲂群体的遗传变异

在本研究中,反交 $3n$ 、异源 $3n$ 、正交 $3n$ 和同源 $4n - F_1$ 群体的遗传变异水平显著地高于 $2n$ 群体。这与邹曙明^[26]从核基因组的 RAPD 和微卫星标记得出的研究结果相似。由于同源 $4n - F_1$ 以及正反倍间杂交 $3n$ 均为同源 $4n$ 的后代,异源 $3n$ 为异源 $4n$ 的后代,同源 $4n$ 和异源 $4n$ 在形成 $2n$ 配子过程中可能存在较频繁的连锁互换;另外,四倍体鱼在传代过程中的等位基因自由组合度增加,导致基因频率、基因型及杂合度均可能发生一些改变。

Nei's 基因多样性指数是种群遗传学领域中最常用的基因多样性指标之一。它类似于生态学领域的辛普森指数(Simpson index),强调等位基因频率而非个数的差异,受样本大小(种群大小)影响较小。因此,在本研究中,尽管取材有限,但各群体的 Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index)在 0.031 5 ~ 0.196 9 之间,这说明不同倍性团头鲂五群体内存在较大程度的遗传变异,尤其是多倍体团头鲂群体(反交 $3n$ 、异源 $3n$ 、正交 $3n$ 和同源 $4n - F_1$ 群体)的遗传变异水平比较高,这为团头鲂四倍体基因库的繁殖、保护和种群复壮提供了一些有价值的信息,也为不育团头鲂的研制、推广以及遗传改良提供了很好的参考资料。

在实验和数据处理过程中得到王成辉副教授的帮助,谨表谢忱。

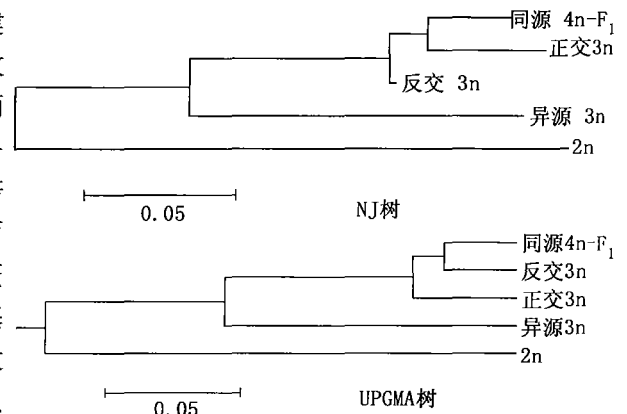


图 2 不同倍性团头鲂群体的聚类关系 (NJ 树和 UPGMA 树)

Fig. 2 Dendrograms of five populations of blunt snout bream with different ploidy levels by NJ and UPGMA method

参考文献:

- [1] 李思发,蔡完其. 团头鲂双向选育效应研究[J]. 水产学报,2000,24(3):201-205.
- [2] Li S F, Cai W Q. Genetic improvement of the herbivorous blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. NAGA, 2003, 26(1):20-23.
- [3] Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Aquaculture, 2004, 238:155-164.
- [4] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations [J]. Aquaculture, 1999, 180:247-264.
- [5] Herwerden L V, John B. Microsatellite markers for coral trout (*Plectropomus laevis*) and red throat emperor (*Lethrinus miniatus*) and their utility in other species of reef fish [J]. Molecular Ecology, 2000, 9:1919-1952.
- [6] 周莉,刘静霞,桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探[J]. 动物学研究, 2001, 22(4):257-264.
- [7] Quattro J M, Avise J C, Vrijenhoek R C. Molecular evidence for multiple origins of hybridogenetic fish clones (Poeciliidae: Poeciliopsis) [J]. Genetics, 1991, 127:391-398.
- [8] Pemberton J M, Slate J, Bancroft D R, et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies [J]. Molecular Ecology, 1995, 4:249-252.
- [9] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using microsatellite marker [J]. Aquaculture, 2000, 182:73-83.
- [10] Johnson S L, Gates M A, Johnson M, et al. Centromere-linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map [J]. Genetics, 1996, 142:1277-1288.
- [11] 孙效文,梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1):1-5.
- [12] Goudie C, Simco B, Davis K, et al. Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation [J]. Aquaculture, 1995, 133:185-198.
- [13] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Anim Genet, 1997, 28:129-134.
- [15] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [M]. Nucl Acid Symp Ser, 1998, 41, 95-98.
- [16] Yeh F C, Yang R C, Boyle, T J B, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, 1997.
- [17] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [Z]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1:47-50.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment briefings [J]. Bioinformatics, 2004, 5:150-163.
- [19] May B, Krueger C C, Kincaid H L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1997, 54:1542-1547.
- [20] Liu Z, Tan G, Kucuktas H, et al. High levels of conservation at microsatellite loci among Ictalurid catfishes [J]. J Hered, 1999, 90:307-311.
- [21] Takagi M, Tanguchi N, Cook D, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species [J]. Fisheries Sci, 1997, 63(2):199-204.
- [22] Rico C, Rico I, Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species [J]. Proc R Soc Lond, 1996, 263:549-557.
- [23] 孙效文,梁利群. 斑马鱼 SSLP 标记检测鲤鱼种间的遗传多态性 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(2):5-6.
- [24] 朱滨,常剑波,谭细畅,等. 湖鲟微卫星 DNA 引物应用于中华鲟亲子关系分析的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1999, 23(6):547-553.
- [25] 孟庆闻,苏锦祥,缪学祖. 鱼类分类学 [M]. 北京:中国农业出版社, 1995:102-108.
- [26] 邹曙明. 团头鲂人工同源和异源四倍体的繁育群体建立及其不同倍性后代的生物学特征分析 [D]. 上海:上海水产大学博士学位论文, 2004:57-68.