

文章编号: 1674-5566(2010)01-0007-05

德国镜鲤养殖群体中抗病与死亡个体遗传结构比较研究

贾智英¹, 池喜峰^{1,2}, 李池陶¹, 张玉勇¹, 石连玉¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用 AFLP 技术对 2007 年、2008 年所采集的我国北方网箱养殖中出现爆发性死亡的德国镜鲤的死亡个体和存活个体分子样品进行遗传结构分析, 以期对德国镜鲤群体内二者遗传变异进行快速而准确的评价。研究表明, (1) 8 对引物组合共扩增出 289 个条带, 其中多态位点比例为 47.40%, 每对引物多态位点比例为 18.8%~56.3%。(2) 死亡和存活个体在两年采集样品中的遗传相似性系数分别为 0.9818 和 0.9862, 遗传分化系数分别为 0.0374 和 0.0379, 表明死亡个体和存活个体遗传分化程度较低。(3) 在两年采集样品中死亡个体平均多态位点比例均低于存活个体, 平均杂合度在 2007 年采集的样品中死亡个体比存活个体低, 在 2008 年采集的样品中二者相等, 表明存活个体遗传变异相对较大, 遗传多样性较高, 而死亡个体遗传变异相对较小, 遗传多样性较低。(4) 个体聚类分析表明死亡个体和存活个体分别在不同程度上进行了聚类。本实验结果表明出现大规模死亡现象德国镜鲤的死亡和存活个体在遗传物质上存在一定的差异, 而这种差异可能导致了二者抗病性能的不同。研究结果将对德国镜鲤抗病品种的选育提供重要参考。

关键词: 德国镜鲤; 抗病性能; 遗传变异; 抗病育种

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Analysis of genetic structure between the death and survival individuals of German mirror carp in cultivated stocks

JIA Zhi-ying¹, CHIXi-feng², LIChi-tao¹, ZHANG Yu-yong¹, SHILian-yu¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In north China, there was a large-scale death phenomenon in the cage culture German mirror carp. In this study, the genetic structure between the death and survival individuals of the German mirror carp was investigated by the amplified fragment length polymorphic (AFLP) technique for samples collected in two years. The results showed that a total of 289 DNA amplified bands were produced using eight pairs of primer combinations selected for the fish. Among them, the proportion of polymorphic loci was 47.40% and each primer varied from 18.8% to 56.3%. The genetic identity was 0.9818 and 0.9862 and the genetic division coefficient F_{st} was 0.0374 and 0.0379 between the death and survival samples collected in two years, which

收稿日期: 2009-07-04

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1204); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系项目 (nycyx-49-05); 黑龙江水产研究所基本科研专项 (2008HSYZX-SJ-07); 农业部水产生物技术重点开放实验室项目 (2008NYBZS-07)

作者简介: 贾智英 (1976-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种方面的研究。E-mail: xiaojiede_41@163.com

通讯作者: 石连玉, E-mail: sls2552@yahoo.com.cn

indicated that little genetic differentiation occurred in the two kinds of fish. The polymorphic loci ratio and gene diversity showed that the death individuals had lower genetic diversity than the survivals. NJ cluster analysis indicated that some deaths and survivals clustered together separately. The genetic diversity and cluster analysis showed that there was genetic difference between the deaths and survivals in the cage culture German mirror carp, which had different impact on the resistance to disease. The results indicate that disease resistance breeding in German mirror carp is feasible.

Key words: German mirror carp; resistance to disease; genetic variation; disease resistance breeding

德国镜鲤 (*Cyprinus carpio* L. mirror) 原产于德国, 人工驯养程度高、生长快、饲料转化率高、肉质鲜美, 是当地池塘主要养殖品种^[1]。我国于1984年引进, 养殖实践表明它对我国高密度肥水养殖条件适应性较差, 抗病力弱, 死亡率较高^[2-3], 为此黑龙江水产研究所对其进行了筛选, 其选育系被全国水产原良种审定委员会审定为宜在全国推广的良种^[4-5]。但近几年在网箱高密度养殖条件下, 德国镜鲤在北方地区尤其是东北地区, 连续多年发生爆发性死亡 (其死亡率高达90%), 严重影响了其产业的健康、稳定和可持续性发展。人工选择强度的加大和生态环境的破坏以及近亲繁殖都可能是导致镜鲤种质资源下降和抗病力减弱的原因^[6]。目前, 除了对导致爆发性死亡的病原体、传播途径和药物控制等加强研究外, 如何对德国镜鲤群体进行遗传操作培育出抗病品种, 是其鱼病控制中一个值得选择的方法。

AFLP技术被广泛用于亲缘关系较近的生物个体或群体遗传结构分析、遗传连锁图谱构建和QTL定位^[7-11]等方面的研究。本研究利用该技术对德国镜鲤死亡个体和存活个体进行遗传变异和遗传分化的研究, 从而评估二者遗传结构差异, 以期对德国镜鲤抗病育种研究提供基本资料。

1 材料与方法

1.1 材料

德国镜鲤采自于辽宁省丹东市养殖网箱, 2007年采集存活和死亡个体分别为32、25尾, 2008年采集存活和死亡个体分别为35、32尾。两年采集的存活个体为爆发性死亡存活下来的个体, 而2007年采集的死亡个体为爆发性中后期死亡个体, 2008年采集的死亡个体为爆发性早期死亡个体。将死亡个体组成的群体记为D, 存活

个体组成的群体记为S。每个个体剪取鳍条, 保存于75%酒精中。所用人工接头购自美国Invitrogen公司, 预扩增和选扩引物由上海生物工程有限公司合成, MseI、EcoRI限制性内切酶和T₄DNA连接酶均购自New England Biolabs公司, PCR反应在TGradient型扩增仪 (德国Biometra公司) 上进行。

1.2 基因组DNA提取

将鳍条从酒精中取出, 用蒸馏水洗净、剪碎, 在消化液 (10 mmol/L TrisHCl pH 8.0, 100 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 100 μg/mL 蛋白酶K) 中55℃彻底消化, 再分别用饱和酚、酚:氯仿:异戊醇抽提除蛋白、乙醇沉淀、1/10 TE溶解, 并将其浓度调至50 ng/μL, -20℃保存备用。

1.3 AFLP反应

AFLP具体试验流程主要参照Vos^[15]操作方法, 采用MseI和EcoRI进行双酶切, 预扩增引物为MseI+1、EcoRI+1。所用选择性引物系从64对引物组合中筛选出的8对稳定性好、多态性较高的引物, 选择性碱基分别为: E-ACG/M-CA₁T, E-AAG/M-CAG, E-AACA/M-CAA, E-ACA/M-CT₁T, E-AAG/M-CTA, E-ACT/M-CT₁T, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTG。

扩增产物在8%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 电泳结果银染检测。

1.4 数据处理和分析

银染之后得到的谱带利用GelPro analyzer 4.5进行分析, 有带记为1, 无带记为0。所有数据统计后形成0、1矩阵。利用数据分析软件PopGene version 1.31进行Nei基因多样性以及多态位点比例、群体遗传相似度和遗传距离、群体遗传分化系数 (F_{st}) 和基因流等的统计分析。应用PhyLiP 3.69和mega 4.1软件以NJ法对2年采

集的抗病和死亡个体分别进行个体聚类分析, bootstrap 抽样 1 000 次, 构建个体间亲缘关系聚类图。

2 结果

2.1 AFLP的扩增结果和遗传多态性分析

利用 8 对引物组合, 从死亡和存活的 124 尾个体的 DNA 样品中, 在分子标记 100 ~ 500 bp 范围内, 检出 289 条清晰扩增片段, 多态位点 137 个, 比例为 47.40%, 每对引物组合扩增的片段为 32 ~ 45 条, 平均 36 条, 每对引物组合多态位点检出率为 18.8% ~ 56.3%, 呈现一定程度的遗传多样性。

2.2 两组个体间的遗传分化

Ne 基因多样性即群体内平均杂合度, 在 2007、2008 年采集的样品中, 存活个体分别为 0.090 0、0.080 1, 死亡个体分别为 0.089 5、0.074 7。多态位点所占的比例, 在 2007、2008 年采集的样品中, 存活个体分别为 41.02%、37.56%, 死亡个体分别为 37.63%、37.56%。按照王伟继等^[19] 差异位点分析方法 (位点出现频率 $\geq 3.3\%$) 和基因频率分析方法分析差异性 AFLP 位点, 未检测到该位点的存在。

按 Ne 等的方法分别计算两年采集样品的遗传相似度和遗传距离。在 2007 年采集样品中, 死亡个体与存活个体之间的遗传相似度为 0.981 8, 二者的遗传分化系数为 0.037 4, 基因流为 12.861 2。2008 年采集样品中, 死亡个体与存活个体之间的遗传相似度为 0.986 2, 二者的遗传分化系数为 0.037 9, 基因流为 12.687 0。

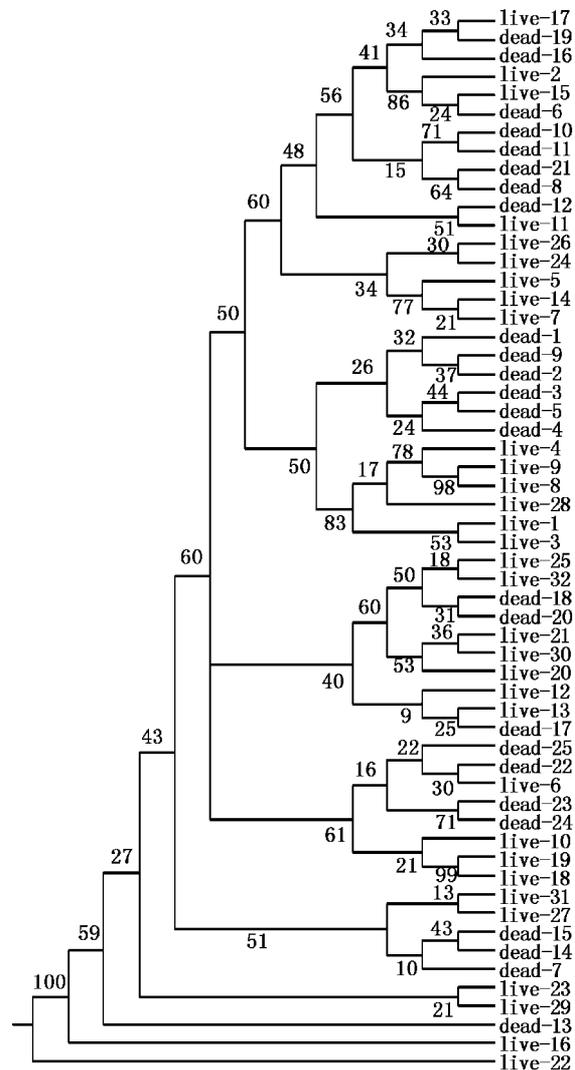
2.3 个体聚类分析

用 NJ 法对采集的样品进行了个体聚类分析, bootstrap 抽样 1 000 次。在 2007 和 2008 年采集的样品中, 死亡个体和存活个体均在不同程度上形成独立的分支 (图 1)。在 2007 年采集的样品中 (图 1 a), 死亡个体主要聚在 2 个分支上 (4 个、6 个), 成活个体主要聚在 4 个分支上 (分别为 3 个、3 个、5 个、6 个), 在 2008 年采集的样品中 (图 1 b), 死亡个体主要聚在 3 个分支上 (分别为 4 个、7 个、8 个), 成活个体主要聚在 3 个分支上 (分别为 8 个、8 个、4 个)。

3 讨论

3.1 遗传改良的方法在鱼类抗病研究中的应用

在鱼类养殖中疾病的防控十分重要, 多年来人工养殖过程中发生了多种疾病, 并且疾病的发生规模和范围越来越大, 尤其是在高密度养殖条件下, 传染性疾病的爆发更易造成严重的损失。对鱼病的控制传统方式主要采用化学药物法, 但药物控制病害的方法存在许多缺点, 如成本高、对生态环境产生污染, 并且长期利用药物控制病害, 还容易使养殖鱼类对药物产生抗性^[17]。在鱼类病害的控制方面还可以采用疫苗免疫方法^[18-19] 或中草药方法^[20-21], 但目前这些方法大多还处于早期研制阶段, 有很多问题没有解决, 还远没有能够满足鱼病控制的需要。通过进行遗



a. 2007年采集样品聚类图

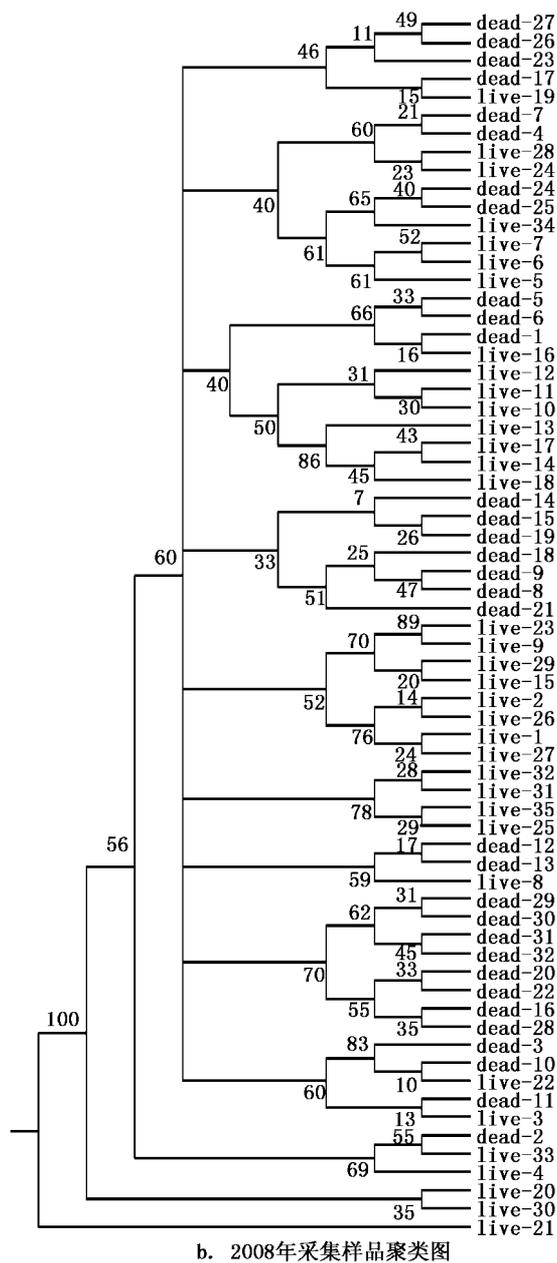


图 1 德国镜鲤抗病个体与死亡个体聚类分析图

Fig 1 The cluster of the dead and survival individuals in German common carp

注: 图中 live表示存活下来的个体, dead表示死亡个体。

传操作来培养出鱼类抗病品种, 是鱼病控制中一个值得选择的方法, 也是 FAO 重点推荐的方法^[22]。目前培育鱼类抗病品种的工作主要集中在鲑鳟鱼类上^[23-24], 而对于鲤鱼相关的研究比较匮乏。

已有的研究表明, 在疾病发生时鱼类群体内具有显著的变异^[17]。对发病群体死亡个体和存活个体的遗传变异进行分析研究, 可从遗传学角

度探索和研究德国镜鲤抗病问题, 从而为培育出具有抗病能力的鱼类新品种提供理论指导。在大多数情况下, 多种基因和环境因素都会对鱼体抗病力产生影响, 从而使抗病力呈现连续的变异。但通常只是将鱼群简单地分为活着的和死亡的两部分来对其抗病力进行统计和评估, 这种简单的处理是用非连续的评判来代替对连续性变异的评判, 会影响结果的准确性或精确性。所以在进行德国镜鲤抗病品种培育研究时, 除了考虑鱼群发病时的变异外, 环境的变异和病原体的变异也应该予以考虑。

3.2 发病德国镜鲤 DP与 SP群体遗传分化情况

一般认为, 平均多态位点比例和平均杂合度是衡量生物群体遗传多样性高低的参数^[25]。李莉好等^[26]对吉富罗非鱼不同选育群体的遗传多样性进行了分析, 表明青岛吉富鱼遗传多样性最高, 而海南吉富鱼遗传多样性最低。刘伟斌等^[13]应用 AFLP分析 3个不同体色花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异, 遗传多样性衡量指标表明, 正常养殖群体遗传多样性最高, 而变异群体较低。本研究采用 AFLP技术对两年采集的死亡个体和存活个体进行遗传变异分析, 结果显示死亡个体多态位点比例和平均杂合度在一定程度上低于成活个体, 由此可见死亡个体遗传多样性水平有所下降。说明, 死亡个体较成活个体遗传变异贫乏, 遗传多样性低下, 这与刘伟斌等^[13]研究结果一致。

群体间的遗传距离揭示群体遗传分化程度, 遗传距离越小, 预示着彼此间的亲缘关系越近。在本研究中, DP与 SP群体间遗传距离较小, 遗传相似性较高 (遗传相似性分别为 0.9818 和 0.9862), 这说明它们亲缘关系较近、分化较弱。根据 Wright^[27]对遗传分化系数的大小与分化程度关系的规定, 分化系数小于 0.05 时, 表示群体之间分化较弱, 本研究中发现 DP与 SP群体间遗传分化程度较低, 大部分遗传变异来自于群体内部 (两批样品遗传分化系数 F_{st} 分别为 0.0374 和 0.0379)。但在聚类分析中, 两年所采集的样品 DP与 SP群体虽然没有分别聚在一起, 但大部分个体均能在不同程度上进行聚类 (图 1), 且 2008 年采集样品聚类结果比 2007 年聚类结果更加集中, 这与 Price^[17]得出的结论鱼群抗病力呈现连

续的变异基本是一致的。个体聚类结果说明两个群体虽然分化较弱,但在抗病过程中已经发生了一定的分化,而不同程度的聚类结果说明其抗病性能是由多基因或多因素控制的。遗传距离和遗传分化系数与聚类分析结果的差异可能是由于 DP与 SF群体间产生遗传分化时间较短,遗传物质上未发生显著分化造成。

总体来看,德国镜鲤死亡个体与存活个体遗传物质上存在一定的差异,因而有望利用选择的方法来筛选出德国镜鲤抗病力强的个体,从而培育出德国镜鲤抗病新品种。

参考文献:

- [1] 陈海燕,刘明华.德国镜鲤、散鳞镜鲤及松浦镜鲤的含肉率及肌肉营养成分的分析[J].水产学杂志,1996,9(1):26-27.
- [2] Hulata G, Moav R, Wohlfarth G. Effects of crowding and availability of food on growth rate of fry in the European and Chinese races of the common carp [J]. J Fish Biol, 2003, 62: 323-327.
- [3] Wohlfarth G W, Moav R, Hulata G. A genotype-environment interaction for growth rate in the common carp growing in intensive farmed ponds [J]. Aquaculture, 1983, 33(1-4): 187-195.
- [4] 沈俊宝,刘明华.鲤鱼育种研究[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2000:132-138.
- [5] 刘明华,白庆利,沈俊宝.德国镜鲤选育及生产应用[J].黑龙江水产,1995,61(3):4-10.
- [6] 李思发.鱼类繁育群体遗传性能的保护[J].水产学报,1988,12(3):283-290.
- [7] 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: 687-694.
- [8] 孙小红,杜胜利,张桂华,等. AFLP, SSR在黄瓜黑星病抗感材料上的多态性比较[J].华北农学报,2006,21(3):105-107.
- [9] Wang B Q, Porter A H. An AFLP-Based Interspecific Linkage Map of Sympatric Hybridizing Colias Butterflies [J]. Genetics, 2004, 168: 215-225.
- [10] Liu Y G, Chen S L, Li B F, et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery founder *Paralichthys olivaceus* using AFLP markers [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33: 993-1005.
- [11] Zimmernan A M, Wheeler P A, Ristow S S, et al. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2005, 247(1-4): 85-95.
- [12] Mickett K, Moron C, Feng J, et al. Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers [J]. Aquaculture, 2003, 228: 91-105.
- [13] 刘伟斌,曾志南,王德祥,等. AFLP分析3个不同体色花尾胡椒鲷养殖群体的遗传变异[J].中国水产科学,2008,15(1):38-46.
- [14] Yue G H, Li Y, Lin L C, et al. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellite [J]. Aquaculture, 2004, 237: 89-102.
- [15] Vos P, Hoogers M, Reijnders M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
- [16] 王伟继,高焕,孔杰,等.利用 AFLP 技术分析中国明对虾的韩国南海种群和养殖群体的遗传差异[J].高技术通讯,2005,15(9):81-86.
- [17] Price D J. Genetics of susceptibility and resistance to disease in fishes [J]. J Fish Biol, 1985, (26): 509-519.
- [18] Luwycke P, Exner M M, Habcock R E, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. Infect Immun, 1995, 63: 3137-3142.
- [19] Dooley J S, Lallier R, Trust T J. Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila* [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1986, 12: 339-344.
- [20] 董国忠,石亚素,马剑茵,等.中草药对海水养殖黄鱼病原弧菌抑菌效果研究[J].水产科学,2007,26(8):436-439.
- [21] 王悦荣,邓炳云,黄鉴洪,等.中草药防治罗非鱼肠炎病研究试验[J].海洋与渔业,2008,8:7-8.
- [22] Price D J. Genetics of susceptibility and resistance to disease in fishes [J]. J Fish Biol, 1985, 26: 509-519.
- [23] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Mol Genet Genomics, 2001, 265: 23-31.
- [24] Moen T, Fjalestad K T, Munck H, et al. A Multiple Testing Strategy for Detection of Quantitative Trait Loci Affecting Disease Resistance in Atlantic Salmon [J]. Genetics, 2004, 167: 851-858.
- [25] Richards C, Lekbeget P L. Temporal changes in allele frequencies and a population history of severe bottlenecks [J]. Conserv Biol, 1996, 10: 832-839.
- [26] 李莉好,喻达辉,黄桂菊,等.吉富罗非鱼不同选育群体的遗传多样性[J].南方水产,2007,3(5):40-48.
- [27] Wright S. The genetical structure of populations [J]. Ann Eugen, 1951, 15: 323-354.