

三种笛鲷的野生群体和养殖群体遗传多样性的微卫星分析*

彭银辉,刘楚吾**,郭昱嵩,刘丽,王中锋

(广东海洋大学水产学院,湛江 524025)

摘要:利用微卫星标记技术,采用10对微卫星引物对南海海域红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropters*)、星点笛鲷(*L. stellatus*)和紫红笛鲷(*L. argentimaculatus*)3种笛鲷的野生种群(HYE、XYE和ZYE)和养殖种群(HYA、XYA和ZYA)进行了遗传多样性分析。10对微卫星引物在6个群体中共检测到78个等位基因,每个位点的等位基因数目在1~8个之间。6个群体的观测杂合度(H_o)为0.2500~1.0000,平均观测 H_o 为:ZYE(0.9550)>ZYA(0.8900),HYE(0.8950)>HYA(0.8400),XYE(0.8450)>XYA(0.8100);平均多态信息含量(PIC)为0.3648~0.7964,各野生群体均大于养殖群体;3种笛鲷的野生群体和养殖群体遗传距离HYE与HYA,XYE与XYA,ZYE与ZYA分别为0.1029,0.0371和0.0135,基因分化系数(F_{st})分别为0.0371,0.0211和0.0352。群体遗传结构分析结果表明:红鳍笛鲷、星点笛鲷和紫红笛鲷的遗传多样性较丰富,养殖群体的遗传多样性较野生群体均有一定程度的降低,野生群体和养殖群体分化较弱。

关键词:笛鲷;养殖群体;野生群体;微卫星;遗传多样性

中图分类号: S188 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-1304(2008)05-0810-05

Microsatellites Analysis on Genetic Diversities of Three Species from Wild and Cultured Populations of Snappers (*Lutjanus*)

PENG Yin-hui, LIU Chu-wu**, GUO Yu-song, LIU Li, WANG Zhong-duo

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhangjiang 524025, China)

Abstract: In order to study genetic information of the valuable fishes of snappers(*Lutjanus*), the genetic diversities of wild populations (HYE,XYE,ZYE) and cultured populations(XYA,XYA,ZYA) of *L. erythropters*, *L. stellatus* and *L. argentimaculatus* from South China sea were detected using microsatellite technique. The amplified products of genomic DNA by 10 microsatellite markers indicated that the number of total alleles were 78 in the three species of snappers, the mean number of alleles of every locus were 1~8, mean observed heterozygosity (H_o) of six populations were: ZYE (0.9550)>ZYA (0.8900), HYE (0.8950)>HYA (0.8400), XYE(0.8450)>XYA (0.8100), the mean polymorphism information content (PIC) ranged from 0.3648 to 0.7964, genetic distances between wild populations and cultured populations of three species of the snappers were 0.1029,0.0371 and 0.0135, respectively, and coefficients of gene differentiation (F_{st}) were 0.0371, 0.0211, 0.0352, respectively. All of these showed that the snappers had high genetic diversity, the level of genetic diversity in wild populations was higher than that in cultured populations and faint genetic differentiation existed between wild populations and cultured populations.

Key words: *Lutjanus*; cultured population; wild population; microsatellite; genetic diversity

红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropters*)、星点笛鲷(*L. stellatus*)和紫红笛鲷(*L. argentimaculatus*)同属于鲈形目(Perciformes)、笛鲷科(Lutjanidae)、笛鲷属(*Lutjanus*),广泛分布于热带和亚热带海域,我国多数产于南海(孟庆闻等,1995),是我国重要的经济海水养殖品种和常见捕捞种。当前海水养殖鱼类多为

小群体,有效亲鱼数量少,常处于被迫高度近交状态,且由于过度捕捞和环境污染等造成野生资源衰竭的趋势,养殖品种日趋混杂引起遗传多样性下降(林浩然,2003)。同其它海水养殖鱼一样,笛鲷物种质资源的开发和保护成为一个急需解决的问题。目前对笛鲷的种质资源和种属关系均有报道,国内在

* 基金项目:国家科技支撑计划项目(No.2007BAD29B03)和国家自然科学基金项目(No. 30671610)资助。

** 通讯作者。Author for correspondence.教授,主要从事水产经济动物繁殖生物学研究。E-mail:<liucw@gdou.edu.cn>.

收稿日期:2008-01-14 接受日期:2008-02-12

RAPD 和 SSR(刘丽和刘楚吾,2006;易乐飞和刘楚吾,2003)、mtDNA 以及 *Cytb* 基因片段的 RFLP(王中锋等,2005)、AFLP(张俊彬和黄良民,2004)等水平上对笛鲷的遗传多样性和种间系统发育进行了研究。本实验应用微卫星技术对红鳍笛鲷、星点笛鲷和紫红笛鲷的野生群体和养殖群体进行遗传结构分析,是对笛鲷种质资源状况的重要佐证和补充,并评估一些人为实践或自然因素所引起的遗传变化,了解其动态变化规律,为人工养殖及品种培育提供相关的遗传背景资料,同时为笛鲷养殖种质资源持续利用提供相关的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

野生种群:红鳍笛鲷(*L. erythropterus*),星点笛鲷(*L. stellatus*),紫红笛鲷(*L. argentimaculatus*)为湛江沿海捕捞野生鱼种;养殖种群:湛江近海网箱养殖鱼种。每种笛鲷的野生种和养殖种各取 20 尾,尾静脉抽血,加入 1/6ACD 抗凝剂于 -20°C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

按 Sambrook and Russell(2002)的方法从血液中提取基因组 DNA,1%的琼脂糖凝胶检测 DNA 的质量和浓度。

1.3 微卫星扩增

引物来自本实验室筛选合成的勒氏笛鲷的微卫星引物(郭昱嵩等,2007),通过改变退火温度和镁离子浓度后,在紫红笛鲷,星点笛鲷和红鳍笛鲷中有良好稳定扩增条带的有 10 对,引物序列、等位基因数等见表 1。dNTP, *Taq* DNA 聚合酶均购自大连宝生物公司。PCR 反应总体积为 $25\ \mu\text{L}$,内含 $2.5\ \mu\text{L}$ $10\times$ Buffer, $0.2\ \text{mmol/L}$ dNTPs, $1.0\ \text{mmol/L}$ MgCl_2 , 引物

各 $0.25\ \text{mmol/L}$, $1.0\ \text{U}$ *Taq* DNA 聚合酶, $50\ \text{ng}$ 左右 DNA 模板。PCR 反应热循环程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s,退火温度 45 s,退火温度延伸 30 s,30 次循环;最后退火温度延伸 5 min。8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物。

1.4 数据统计与分析

将微卫星标记电泳图谱中的每一条 DNA 带作为该座位上的一个等位基因,并确定个体基因型。用 genepop4.0 计算各微卫星位点在 6 个群体中的等位基因频率、观测杂合度(H_o)、预期杂合度(H_e)、度多态信息含量(PIC)、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(D)和遗传分化系数(F_s)等指标(刘云国,2005),采用 F 检验(李春喜等,2003)野生和养殖群体观测杂合度的差异显著性。用 DISPAN 软件根据 Nei(1972)的方法计算遗传距离(D_A)、邻近法构建系统发生树,并用 Bootstrap test 检验所得聚类结果的可靠性。

2 结果和分析

2.1 微卫星标记扩增结果

10 对微卫星引物在 6 个群体中共检测到了 78 个等位基因,多数集中在 100~300 bp。除 Lru020 在星点笛鲷中表现为单态外,其余均表现为多态,Lru010 和 Lru029 在野生和养殖红鳍笛鲷群体中扩增的等位基因最多,分别达到 13 和 12 个。每个位点的等位基因数为 1~8 个,不同座位上的等位基因数为 3~18 个,平均每个座位上的等位基因数为 7.8 个,表现出高度的多态性。6 个群体(HYE、HYA、XYE、XYA、ZYE 和 ZYA)检测到的等位基因数分别为:48、38、32、24、29 和 27,与野生笛鲷群体相比,养殖群体检测到的等位数目均有所下降。部分扩增结果如图 1 所示。

表 1 10 对微卫星引物的特征

Table 1 Characteristics of 10 pairs of microsatellite primers

座位 Locus	引物序列 Primer sequences(5'-3')	重复序列 Repeat motif	T/ $^{\circ}\text{C}$	等位基因 No.of alleles
Lru001	F:TCCCTCTGTTGTTGAAAG; R:CCTGATCTCGATAGTGCC	(CA) ₃₀	56	9
Lru042	F:TTGGGGACGGCAGATACA; R:GAGGTGGAGTGAAAGAAGATAA	(CA) ₁₀	55	11
Lru010	F:GCAAAACGGAGGAAACAAA; R:CTGAAGCTGCTGAGGACTGA	(CA) ₂₈	58	18
Lru019	F:AAATGCGATCACCAAG; R:TTAGGTAACCTCAAACCTCC	(CA) ₁₀	56	9
Lru014	F:TGGAGGAAAATCTGTCTA; R:AGAGTAGCAGGTTTGATG	(AC) ₈	54	8
Lru020	F:CACCCAAGTACACYCATG; R:GTGCAGCTTTCTCCGTAT	(CA) ₁₀	58	3
Lru004	F:GATGGCAATGGAAGGCACA; R:CTGGGATCTATGAAAGCAAGAC	(CA) ₁₄	60	4
Lru023	F:ACACCCAGTAAACACCG; R:GCTGCTAACACGCTAACC	(AC) ₈ (CA) ₂ (CA) ₅ (CA) ₄	54	9
Lru029	F:CCGTTACGAAATCATCAG; R:TGCCTCCAGACTCAAATA	(AC) ₉	55	10
Lru031	F:TGTCACTTACCCATTCC; R:TTCGCTTTGATATTCACG	(CA)(AC) ₄	58	6

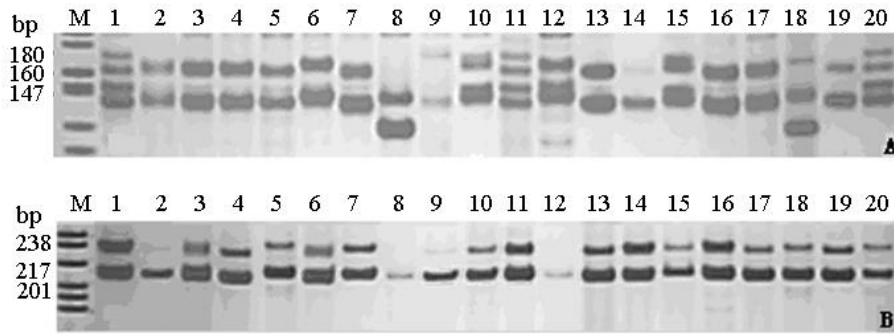


图 1. 引物 Lru010 在 HYA 和 XYA 中的扩增电泳图谱

Fig.1. Electrophoresis pattern of microsatellite locus amplified by primer Lru010 in HYA and XYE

A. 1~20, HYA; M, PBR322/Msp DNA marker; B. 1~20, XYA; M, PBR322/Msp DNA marker.

2.2 6 个笛鲷群体内遗传变异分析

10 个位点在 6 个群体观测杂合度范围为 0~1, 见表 2。平均观测杂合度(H_o)分别为:HYE(0.8950) >HYA (0.8400),XYE (0.8450)>XYA(0.8100),ZYE (0.9550)>ZYA(0.8900)。F 检验观测杂合度的差异显著性:野生和养殖群体观测杂合度差异不显著

($P > 0.05$)。各群体多态信息含量 (PIC) 为 :HYE (0.5922) > HYA (0.5032), XYE (0.4584) > XYA (0.3797), ZYE(0.4154)>ZYA(0.4330), H_o 和 PIC 值均为野生群体大于养殖群体。Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D) 在 6 个群体中均表现正值,说明所有群体中都存在杂合子过剩现象。

表 2 10 个微卫星座位在笛鲷 6 个群体中的平均等位基因数、平均多态信息含量(PIC)、平均观测杂合度 (H_o)、平均期望杂合度(H_e)和平均 Hardy-Weinberg 平衡指数 (D)

Table 2 The meaning number of alleles ,mean polymorphism information content(PIC),mean observed heterozygosity(H_o),mean expected heterozygosity(H_e) and Hardy-Weinberg departure value(D) of the 10 microsatellites in the 6 populations of snappers

种群 Population	平均等位基因数 Mean alleles	H_o 平均值 Mean H_o	H_e 平均值 Mean H_e	D 平均值 Mean D	PIC 平均值 Mean PIC
HYE	4.80	0.8950	0.6478	0.3080	0.5922
HYA	3.80	0.8400	0.5754	0.4977	0.5032
XYE	3.20	0.8450	0.5443	0.5568	0.4584
XYA	2.40	0.8100	0.4340	0.7176	0.3797
ZYE	2.90	0.9550	0.5814	0.7000	0.5414
ZYA	2.70	0.8900	0.5524	0.6220	0.4300
YE	3.63	0.8983	0.5908	0.5249	0.5007
YA	2.97	0.8466	0.5206	0.6214	0.4387

YE, 野生群体; YA, 养殖群体.

YE, wild populations; YA, cultured populations.

表 3 三种笛鲷鱼 6 个群体的奈氏遗传距离(上三角)和基因分化系数(下三角)

Table 3 Nei's genetic distance(above diagonal) and coefficients of gene differentiation(below diagonal)

种群 Populations	HYE	HYA	XYE	XYA	ZYE	ZYA
HYE		0.1029	0.6363	0.6487	0.7280	0.7272
HYA	0.0336		0.5783	0.5877	0.7328	0.7197
XYE	0.3084	0.3369		0.0371	0.5772	0.5621
XYA	0.3455	0.3726	0.0113		0.5896	0.5712
ZYE	0.3371	0.3739	0.3156	0.3563		0.0135
ZYA	0.3389	0.3718	0.3042	0.3447	0.0027	

YE and YA are the same as Table 2.

2.3 群体间的遗传分化

由表3可见,红鳍笛鲷、星点笛鲷和紫红笛鲷的养殖群体和野生群体间的基因分化系数分别为:0.0371、0.0211和0.0352, HYE与YEA最大,XYE与XYA之间最小。用DISPAN分析软件,计算得出3种笛鲷的野生和养殖群体的遗传距离为:0.1029、0.0371和0.0135。遗传距离和基因分化系数分析结

果一致。

利用DISPAN软件按邻近法构建系统发生树,图2反映出了3种笛鲷鱼的6个群体间的关系,每种鱼的野生群体和养殖群体各聚为一支,同时聚类显示星点笛鲷与紫红笛鲷的亲缘关系较近,首先聚在一起,然后与红鳍笛鲷聚在一起。

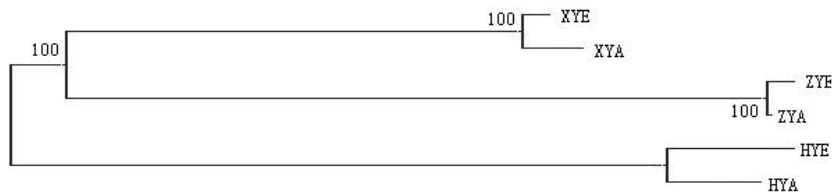


图2. 基于奈氏遗传距离(D_A)值的6个笛鲷鱼群体的NJ聚类图

Fig.2. NJ dendrogram of 6 populations of snappers base on Nei's genetic distance(D_A)

YE and YA are the same as Table 2.

3 讨论

基因杂合度(H_o)又称基因多样性,反映个体在多个座位上的遗传变异,一般认为它是衡量群体变异的一个较好参数(Botstein *et al.*, 1980),可反映群体的遗传一致性的程度。群体杂合度越低,表明该群体的遗传一致性越高,群体遗传变异越少,群体遗传多样性越低。本研究显示3种养殖笛鲷群体的遗传多样性低于野生种群,但不显著,说明野生笛鲷和养殖笛鲷的遗传多样性差异不显著。

多态信息含量(PIC)是指一个后代所获的某个等位基因标记来自它亲代的同一个等位标记的可能性大小,平均PIC是衡量等位基因片段多态性的很好指标。当 $PIC > 0.5$ 时,为高度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态位点; $PIC < 0.25$ 时为低度多态位点(Suci *et al.*, 2005)。本研究中6个群体的平均多态信息含量为0.4330~0.5922,除两个星点笛鲷群体表现为中度多态,其余大于0.5表现为高度多态,平均PIC表明3种笛鲷鱼群体的遗传多样性比较丰富,与已有研究的结论相符(刘丽和刘楚吾, 2006;王中铎等, 2005)。

Hardy-Weinberg遗传偏离指数(D)也叫固定指数,反映 H_o 和 H_e 之间的平衡关系,若 $D > 0$,反映杂合子过剩, $D < 0$,反映杂合子缺失。本研究结果显示6种笛鲷鱼总体都存在杂合子过剩的现象,原因可能是养殖群体为一个有限亲本所产生的小的自带群体,由于瓶颈效应(bottleneck effect)和创造者效应(founder effect)而导致连锁不平衡(Suci *et al.*,

2005)。本研究中天然野生群体也存在杂合子过剩,这与笛鲷种群自身的结构有密切相关。一方面由于鱼类基因组的可塑性大带来种间容易发生杂交发生基因交流(罗静等, 2000),3种笛鲷种间或和其它种发生了一定程度的杂交,导致基因高度杂合,另一方面可能是笛鲷受人为干扰等因素使其种群结构和性别比等受到影响而产生的。

遗传分化系数是群体间遗传分化程度的一个重要参数,其大小与分化程度的关系为(Wright, 1951):0~0.05表示群体间分化很弱,0.05~0.15表示分化中等,0.12~0.25表示分化大,大于0.25表示分化极大。本研究对6个笛鲷群体的遗传分化系数分析表明,野生群体和养殖群体的分化系数在0.0027~0.0336之间,群体分化很弱, HYE与HYA的分化系数最大为0.0336, ZYE与ZYA的分化系数最小为0.0027,说明两群体没有明显的分化。群体间的遗传距离:HYE与HYA间的遗传距离最大(0.1029),邻近法构建系统发生树显示每种笛鲷鱼的野生种群和养殖种群各聚为一支,显示养殖群体和野生群体已经有了一定程度的分离。

对鱼类的养殖群体和野生群体的遗传多样性研究已有报道。张俊彬等(2004)利用AFLP技术研究广东、海南的几个紫红笛鲷群体发现,紫红笛鲷养殖群体已经与野生群体存在一定程度的遗传隔阂,这与本研究结论一致;张志伟等(2006)对草鱼的1个野生群体和2个养殖群体的微卫星标记时得出:草鱼养殖群体遗传多样性显著下降,并指出近交引起遗传多样性下降;Skaala *et al.* (2004)研究大西洋鲑

中认为42%等位基因在养殖群体中丢失的主要原因在于建群者效应。本研究显示笛鲷的养殖群体平均杂合度和多态信息含量较野生群体下降但未达到显著差异,且有一定程度的分化,说明目前三种笛鲷的种质资源丰富,环境污染、过度捕捞、人工繁殖育苗等因素还未对其造成很大影响。而养殖笛鲷群体的遗传多样性下降主要可能是人工养殖中封闭群体

的亲本数量小、亲本的不随机交配等因素加速种质的同质化引起的,人为干预还可能会导致稀有基因丢失而引起遗传多样性下降。3种笛鲷中平均 H_o 、平均PIC和 F_{st} 显示红鳍笛鲷的2个群体分化最大,建议及早采取相关的有效措施对养殖群体复壮,使笛鲷种质资源得以保护。

参 考 文 献

- Botstein D, White R L A and Skalnicky M H. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism (J). *American Journal of Human Genetic*, 1980,32:314
- Guo Y S(郭昱嵩), Wang Z D(王中铎) and Liu C W(刘楚吾). Rapid isolation and characteristics analysis of microsatellite from *Lutjanus russelli* (J). *Hereditas* (遗传), 2007, 29(3): 355~359 (in Chinese with English abstract)
- Li C X(李春喜), Wang Z H(王志和) and Wang W L(王文林). *Biological Statistics* (M). Beijing: Science Publishing Company, 2003.81~90 (in Chinese)
- Lin H R (林浩然). The sustainable exploitation of marine fish resources and research directions of science and technology for marine fish (J). *Engineering Science* (中国工程科学), 2003,(3):27~43(in Chinese with English abstract)
- Liu L (刘 丽) and Liu C W (刘楚吾). Genetic diversity and molecular markers of 5 species of snapper (J). *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2006, 14 (3):349~355(in Chinese with English abstract)
- Liu Y G (刘云国), Cheng S L (陈松林) and Li B F (李八方). Genetic structure analysis for the cultured stock of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by microsatellite marker (J). *Marine Fisheries Research* (海洋水产研究), 2005,26(5): 27~33 (in Chinese with English abstract)
- Luo J (罗 静), Yang J X (杨君心) and Zhang Y P (张亚平). Genetic basis of fish diversity (J). *Zoological Research*(动物学研究), 2000, 21 (2):158~164 (in Chinese with English abstract)
- Meng Q W(孟庆闻), Su J X(苏锦祥) and Miu X Z(缪学祖). *Fish Taxonomy*(M). Beijing: China Agricultural Press, 1995, (in Chinese)
- Nei M. Genetic distance between populations (J). *American Nature*, 1972,106(949):283~292
- Sambrook J and Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (M). Beijing: Sciences Press, 2002,461~471 (in Chinese)
- Skaala O, Hbyheim B and Glover K. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Allelic diversity and identification of individuals (J). *Aquaculture*, 2004,240:131~143
- Suci A, Uthairt N and Worawut K. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coiodes* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers (J). *Marine Biotechnology*, 2005, 1: 1~10
- Wang Z D(王中铎), Liu C W(刘楚吾) and Guo Y S(郭昱嵩). Comparison on RFLP of mitochondrial DNA and *Cytb* gene segment for 5 species in *Lutjanus* (J). *Journal of Fisheries of China* (水产学报), 2005,29 (3): 327~332 (in Chinese with English abstract)
- Wright S. The genetical structure of populations (J). *Animals Eugenics*, 1951,15:323
- Yi L F (易乐飞) and Liu C W (刘楚吾). Genetic diversity of purple snapper (*Lutjanus erythropterus*) based on RAPD (J). *Journal of Zhangjiang Ocean University* (湛江海洋大学学报), 2003,23(6):12~16 (in Chinese with English abstract)
- Zhang J B(张俊彬) and Huang L M(黄良民). Genetic diversity analysis of AFLP of *Lutjanus erythropterus* (J). *Journal of Tropical Oceana Graphy*(热带海洋学报), 2004, 23(5): 50~55 (in Chinese with English abstract)
- Zhang Z W(张志伟), Cao Z M(曹哲明) and Yang H(杨 弘). Microsatellites analysis on genetic variation between wild and cultured populations of *Ctenopharyngodon idella* (J). *Zoological Research* (动物学研究), 2006,27 (2):189~196(in Chinese with English abstract)