

半滑舌鳎 DNA 的群体遗传变异

韩志强^{1,2}, 庄志猛¹, 高天翔², 刘进贤², 李玉晖², 王志勇³, 唐启升¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003; 3. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:采用 AFLP、RAPD 和线粒体细胞色素 b 基因 (*Cyt b*) 片段序列分析技术对半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 群体遗传变异进行研究。分别采用 5 对选择性引物和 18 条随机引物对半滑舌鳎 3 个群体 (黄海野生群体、渤海野生群体、养殖群体) 进行分析。AFLP 和 RAPD 分析结果表明, 黄海群体的遗传多样性高于渤海群体, 养殖群体的遗传多样性最低。利用 Shannon 多样性指数和基因分化系数进行遗传变异来源估算, 结果表明, 遗传变异主要来自于群体内。同其他鱼类相比, 半滑舌鳎群体遗传多样性水平较低。对黄海、渤海野生群体共 37 个个体的线粒体 *Cyt b* 基因片段序列进行分析, 共检测出 5 种单倍型, 渤海群体内个体序列完全相同, 共享单倍型 H1; 在黄海群体中除检测到单倍型 H1 外, 还检测到其余 4 种单倍型。Cyt b 序列分析结果表明, 黄海群体遗传多样性较渤海群体丰富, 个体间序列变异很小, 个体间核苷酸差异数在 0~1 之间, 两群体间无显著遗传差异。通过比较 3 种分子标记对半滑舌鳎群体间遗传差异的检测和群体间遗传距离的计算, 显示 AFLP 标记对群体间遗传差异的检测最为灵敏, 是一种理想的分子标记。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 192-200]

关键词:半滑舌鳎; 遗传多样性; AFLP; RAPD; 细胞色素 b

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)02-0192-09

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* Günter) 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、舌鳎科 (Cynoglossidae)、舌鳎属 (*Cynoglossus*), 俗称鳎目、鳎米、牛舌头。半滑舌鳎是一种暖水性底层鱼类, 在中国沿海均有分布; 在黄海和渤海较常见^[1]。半滑舌鳎活动范围小、营养等级低、食性温和, 具有个体大、生长快和市场价格高等优良性状, 是一种理想的增殖对象^[2]。迄今, 有关半滑舌鳎的研究主要集中在生长、耗氧量、食性、胚胎发育与繁殖等方面^[4-14], 涉及半滑舌鳎群体遗传学方面的研究至今未见报道。随着半滑舌鳎人工养殖规模的扩大, 有必要对野生半滑舌鳎群体和养殖群体的遗传多样性和种质资源状况进行研究, 从而促进半滑舌鳎的资源保护和人工养殖的可持续发展。

随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic of DNA, RAPD) 具有快速、灵敏、简单等特点, 已被广泛应用于动植物的系统进化研究、种质鉴定、遗传多样性检测以及品系鉴定等方面^[15-16]。扩增片段多态性 (Amplified Fragment Length Poly-

morphism, AFLP) 作为一种新的分子标记技术, 兼有 RFLP 的可重复性和 RAPD 的简便性, 现已被广泛应用到遗传图谱构建、分子育种、指纹分析及遗传多样性分析等研究领域^[17]。中国应用 AFLP 技术在贝类、对虾等主要无脊椎经济物种上进行了大量的研究^[18-22], 但在鱼类方面的研究较少, 迄今, 国内仅见关于真鲷、大黄鱼、褐牙鲷、紫红笛鲷等几种海水鱼类遗传多样性的研究报道^[23-27]。线粒体 DNA 已成为研究动物起源进化及群体遗传分析理想的研究对象。Cyt b 为线粒体 DNA 上的蛋白质编码基因, 其进化速度较快, 适合种群水平差异的检测, 目前对其研究最为广泛^[28]。

本项目利用 AFLP 技术、RAPD 技术和 Cyt b 基因部分序列分析这 3 种分子标记技术分析了中国应用 AFLP 技术在贝类、对虾等主要无脊椎经济物种上进行了大量的研究^[18-22], 但在鱼类方面的研究较少, 迄今, 国内仅见关于真鲷、大黄鱼、褐牙鲷、紫红笛鲷等几种海水鱼类遗传多样性的研究报道^[23-27]。线粒体 DNA 已成为研究动物起源进化及群体遗传分析理想的研究对象。Cyt b 为线粒体 DNA 上的蛋白质编码基因, 其进化速度较快, 适合种群水平差异的检测, 目前对其研究最为广泛^[28]。

收稿日期: 2006-08-29; 修订日期: 2006-11-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271027); 国家“863”计划资助项目 (2005AA603110)。

作者简介: 韩志强 (1981-), 男, 博士研究生, 研究方向为群体遗传学。

通讯作者: 庄志猛. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

鲷遗传育种研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

半滑舌鲷渤海和黄海群体样品于 2003 年 3~4 月期间用底拖网捕自莱州市三山岛和青岛市田横岛外海;养殖群体由莱州市明波水产公司提供,为室内工厂化养殖群体,其亲本来源于渤海海区,为人工繁殖的子一代。取样品背部肌肉组织于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;在每个群体随机挑选 30 个个体用于 AFLP 和 RAPD 分析,随机抽取 18 个黄海群个体和 19 个渤海群个体用于 *Cyt b* 基因序列分析。

1.2 DNA 提取

采用蛋白酶 K 和苯酚/氯仿法提取半滑舌鲷基因组 DNA。用 HITACHI U-2001 紫外分光光度计测定 DNA 浓度,并通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 AFLP 分析

参照 Vos 等^[29]和 Wang 等^[30]的方法构建 AFLP 图谱,取 100 ng 基因组 DNA 用 *EcoR* I 和 *Mse* I 进行双酶切,酶切片段与 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头连接;取 1 μL 酶切产物进行预扩增。预扩增反应程序为:首先 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min;接着 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 20 个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。预扩增产物 1:10 稀释后,用于选择性扩增,采用 5 对引物组合进行 AFLP 分析;选择性扩增程序为:首先 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 再 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, (每循环退火温度降低 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 10 个循环后变为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 26 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。接头序列、预扩增引物序列和选择性引物序列见表 1。选择性扩增产物通过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,电泳结束后采用银染染色检测。

1.4 RAPD 分析

RAPD 反应条件与 Williams 等^[31]基本相似。PCR 反应总体积为 25 μL , 包括: $10\times$ PCR Buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物(上海生工) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶(Promega) 1 unit, 以及 10 ng/ μL 基因组 DNA 2 μL , 其余用灭菌双蒸水补足。在 PCR 仪上经 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后进行 45 个循环,每一循环包括 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 最后在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。RAPD 产物用含有溴化乙锭 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,于 Bio-RAD Gel

Doc 1000 自动成像仪上观察并打印电泳图谱。

表 1 AFLP 分析所用的接头、预扩增、选择性扩增引物

Tab.1 Adaptor and primer sequences used in AFLP analysis

引物 Primer	序列 Sequence
接头 Adapters	
<i>EcoR</i> I-adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Mse</i> I-adapter	5'-GACGTGAGTCCTGAG-3' 5'-TACTCAGGACTCAT-3'
预扩增引物 Pre-amplification primer	
<i>EcoR</i> I	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>Mse</i> I	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
选择性扩增引物 Selective amplification primer	
E-AGA/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-AAC/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-AGG/M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-AGG/M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-ACT/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTCATC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'

1.5 线粒体 *Cyt b* 基因片段扩增与测序

所用引物序列为 L147342-Glu: 5'-AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT-3' 和 H151492-Cyb: 5'-CTC AGA ATG ACATTT GTC CTC A-3' (上海博亚合成)。PCR 反应体系为 25 μL , 包括 2.0 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 各种引物, *Ex Taq* 酶 0.75 unit, 50 ng 基因组 DNA。反应条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 后经过 40 个循环, 每个循环包括 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因片段经 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海华舜)纯化回收, 取适量回收产物做测序反应。序列分析仪为美国 ABI 公司 3700 型全自动序列分析仪, 进行双向测序, 以确保 DNA 序列的可靠性。

1.6 数据分析

1.6.1 AFLP 和 RAPD 对 AFLP 和 RAPD 数据进行统计, 根据电泳结果, 将每个条带作为 1 个位点, 有扩增条带且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建

AFLP和RAPD原始数据表征矩阵。对AFLP和RAPD数据用两种方法进行分析:其一,AFLP和RAPD标记都是显性标记,依据原始数据矩阵统计总位点数、多态位点数,计算Shannon指数等;其二将每1个条带视为1个位点,进行Hardy-Weinberg平衡假设,计算群体遗传期望杂合度和基因分化系数。统计的遗传学参数主要如下:

多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$

遗传相似系数 $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中, N_{ij} 为个体 i 与 j 共有的条带数量; N_i 、 N_j 分别为个体 i 与 j 各自具有的条带数量。

遗传距离 $D = -\ln S$, 式中 S 为相似系数。

Shannon 多样性指数 $H_0 = -\sum X_i \ln X_i / N$, 式中, X_i 表示位点 i 在某一个群体中的出现频率, N 表示该群体中检测到的位点总数。 n 个不同群体内的平均多样性: $H_{\text{pop}} = -\sum H_0 / n$, 其中 n 为研究的群体数。群体多样性: $H_{\text{sp}} = -\sum X \ln X / n$, 其中 X 为位点 i 在 n 个群体中的总显性频率。由此可计算, 群体内及群体间遗传多样性所占的比例: $H_{\text{pop}} / H_{\text{sp}}$, $(H_{\text{sp}} - H_{\text{pop}}) / H_{\text{sp}}$ 。

预期杂合度 $H_e = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为单个位点上的等位基因频率。

基因分化系数 G_{st} 为总群体平均杂合度 (H_s) 和各

群体内平均杂合度 (H_t) 的函数, 即 $G_{\text{st}} = 1 - H_s / H_t$ 。

利用 POPGEN1.32 计算群体间的遗传相似度和遗传距离, UPGMA 系统树由 MEGA3.0 软件构建。

1.6.2 Cyt b 用 DNASTAR 软件对测得序列进行编辑、排序比对。利用 DNASP 软件计算多态位点、核苷酸多样性指数及单倍型多样性指数, 用 Arlequin 软件进行 AMOVA 分析估计群体遗传变异的来源。

2 结果与分析

2.1 AFLP 分析

所选用的 5 对选择性引物, 从黄海、渤海和养殖 3 个群体共计 90 尾半滑舌鲷的 DNA 样品中共检出了 315 个不同长度的扩增片段 (60~330 bp), 其中 42.5% 的片段 (计 134 条) 为 3 个群体所有个体共享, 57.5% 的片段 (181 条) 只从部分群体或个体中检测出呈多态。如果将每个片段当作一个基因位点, 各对选择性引物的检测能力平均为 63 个 (44~80), 以 E-AGG/M-CTG 的扩增能力最强, E-AGA/M-CAC 的扩增能力最低 (表 2); 就各对引物检出的基因型 (某一个体扩增谱带组合形式) 而言, 没有发现任何两个个体之间具有相同的基因型; 此外, 也未发现可以用于区分 3 个群体的特异性标记谱带。图 1 显示了 E-AGG/M-CTG 引物扩增得到的半滑舌鲷 AFLP 指纹图谱 (局部)。

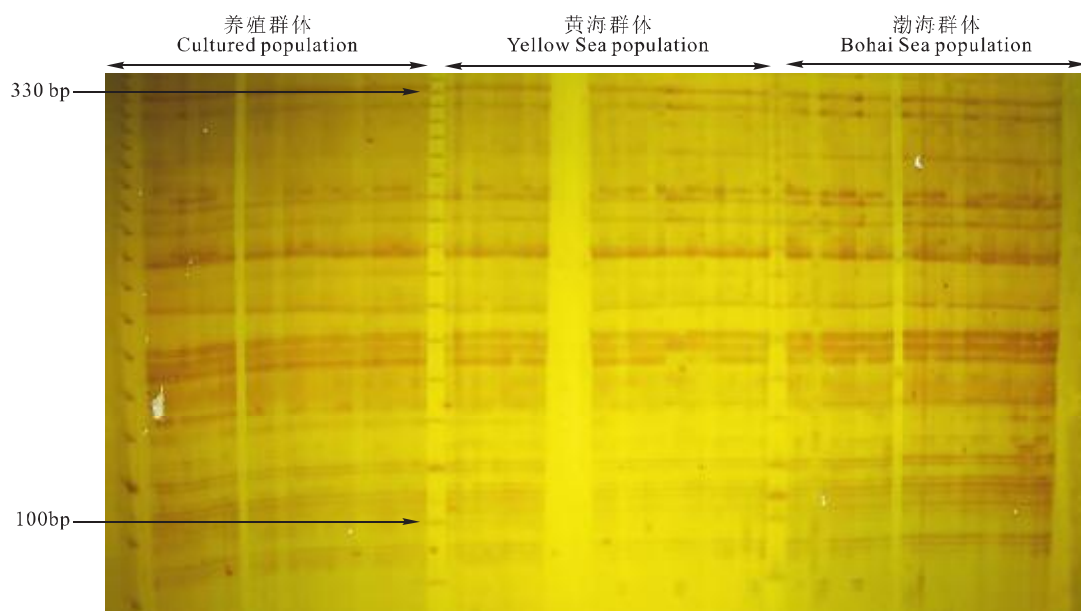


图 1 用 E-AGG/M-CTG 引物扩增得到的半滑舌鲷 AFLP 指纹图 (局部)

Fig.1 AFLP patterns of *C. semilaievis* using primer set E-AGG/M-CTG (part)

表 2 AFLP 选择性扩增引物组合及其从半滑舌鲷基因组 DNA 中检出的位点数

Tab.2 Primer sets used for AFLP and numbers of amplified bands observed from AFLP analysis of *C. semilaevis*

引物组合 Primer set	样本数 Individuals	检出位点数 Number of loci	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点比例 / % Percentage of polymorphism	基因型数 Genotypes
E-AGG /M-CTC	90	59	48	81.36	90
E-AGA /M-CAC	90	44	22	50.00	90
E-AGG /M-CTG	90	80	38	48.72	90
E-AAC /M-CAC	90	54	53	66.25	90
E-ACT /M-CAT	90	78	20	37.03	90
总数 Total	90	315	181	56.82	90

如表 3 所示,上述 5 对引物在 3 个群体内检出的总位点数分别为 281 个(黄海群体)、265(渤海群体)和 249(养殖群体),其中多态位点数目及其比例分别为 140 个(49.8%)、118 个(44.5%)和 100 个(40.2%)。可见,黄海群体的多态位点比例最高,渤海群体次之,养殖群体最低。以 Shannon 多样性指数表示的遗传变异度也呈现出同样的态势,即:黄海群体(0.136 9) > 渤海群体(0.107 6) > 养殖群体(0.097 8),其中有 83.86% 的遗传变异源于群体内,

16.04% 的变异源于群体间。如果根据 Hardy-Weinberg 平衡假设,计算 3 个群体的预期杂合度,同样表现出“黄海群体→渤海群体→养殖群体”递减的趋势,而群体间的遗传分化系数则为 0.142 8(14.28% 的变异来源于群体间)。表 4 列出了半滑舌鲷 3 个群体之间的遗传相似度和遗传距离,并根据遗传距离构建了 3 个群体的 UPGMA 系统树(图 2)。可见,根据 AFLP 数据在 3 个群体中,渤海群体与养殖群体遗传距离最小,遗传相似度最高。

表 3 由 AFLP 和 RAPD 分析得出的半滑舌鲷 3 个群体的遗传多样性参数

Tab.3 Parameters of genetic diversity for 3 populations of *C. semilaevis* based on AFLP and RAPD data

群体 Population	总扩增位点数 / 多态位点比例 / % Number of total loci / Percentage of polymorphism		Shannon 多样性指数 (H_o) Shannon diversity index		预期杂合度 (H_e) Expected heterozygosity		基因分化系数 (G_{st}) Coefficient of gene differentiations		H_{pop}/H_{sp}	
	AFLP	RAPD	AFLP	RAPD	AFLP	RAPD	AFLP	RAPD	AFLP	RAPD
黄海 Yellow Sea	281 /49.8	150 /80.0	0.136 9	0.381 3	0.087 9	0.252 6				
渤海 Bohai Sea	265 /44.5	150 /76.0	0.107 6	0.379 3	0.064 6	0.252 4	14.28%	3.63%	83.86%	96.04%
养殖 Cultured	249 /40.2	150 /74.0	0.097 8	0.366 5	0.057 7	0.242 2				

注:来源于群体间遗传变异比例值为: $1 - H_{pop}/H_{sp}$ 。
Note: Percentage of genetic variance attributed to differences among populations: $1 - H_{pop}/H_{sp}$.

表 4 半滑舌鲷 3 个群体的遗传相似度和遗传距离

Tab.4 Genetic similarity and genetic distance among three populations of *C. semilaevis* based on AFLP and RAPD data

群 体 Population	AFLP			RAPD		
	黄海 Yellow Sea	渤海 Bohai Sea	养殖 Cultured	黄海 Yellow Sea	渤海 Bohai Sea	养殖 Cultured
黄海 Yellow Sea	—	0.910 6	0.917 1	—	0.981 7	0.976 5
渤海 Bohai Sea	0.093 6	—	0.919 2	0.018 4	—	0.982 8
养殖 Cultured	0.086 6	0.084 3	—	0.023 7	0.017 3	—

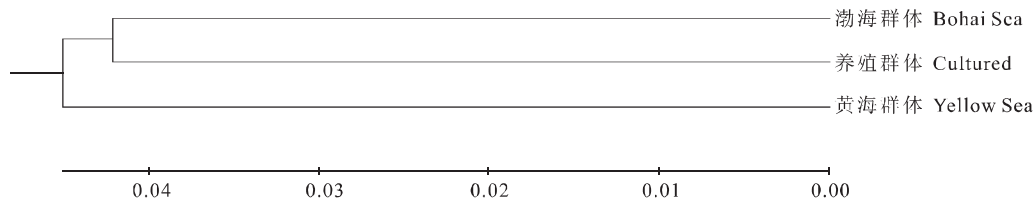


图 2 根据 AFLP 计算的遗传距离,用 UPGMA 方法构建的 3 个群体半滑舌鲷的系统树

Fig.2 UPGMA dendrogram of the 3 populations of *C. semilaevis* based on AFLP data

2.2 RAPD 分析

从 40 个 10 bp 随机引物中选取 18 个扩增效果良好的引物用于检测半滑舌鲷 3 个群体的遗传变异。每个随机引物扩增的 RAPD 条带数目在 1~12 之间,在 3 个群体中共扩增出 150 条清晰的条带,其

中有 1 个引物 (S90) 在所有个体间呈现单态,其余 17 个引物产生多态 (表 5)。黄海、渤海和养殖群体的多态位点数 (多态位点比例) 分别为 120 (80%)、114 (76%) 和 111 (74%)。图 3 为引物 S98 对半滑舌鲷 3 个群体 90 个个体的扩增图谱。

表 5 选取的 18 个随机引物序列和扩增位点数

Tab.5 Number of loci and sequence of 18 arbitrary primers used in this study

引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	位点数 Number of loci	引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	位点数 Number of loci
S83	GAGCCCTCCA	11	S366	CACCTTTCCC	8
S84	AGCGTGTCTG	4	S368	GAACACTGGG	12
S87	GAACCTGCGG	7	S369	CCCTACCGAC	10
S88	TCACGTCCAC	8	S370	GTGCAACGTG	10
S89	CTGACGTCAC	7	S371	AATGCCCCAG	6
S90	AGGGCCGTCT	1	S372	TGGCCCTCAC	11
S91	TGCCCCGTCT	7	S374	CCCGCTACAC	10
S93	CTCTCCGCCA	8	S375	CTCCTGCCAA	10
S98	GGCTCATGTG	9	S376	GAGCGTCGAA	11

对 18 种引物所检测到的表型频率进行遗传变异计算分析,结果表明,3 个群体以 Shannon 多样性指数表示的平均遗传多态度 (H_{pop}) 为 0.375 7, 黄海群、渤海群和养殖群的遗传多态度 (H_0) 分别为 0.381 3、0.379 3 和 0.366 5; 群体内的遗传变异均值 (H_{pop}/H_{sp}) 为 0.960 4, 而群体间的遗传变异值 ($1 - H_{pop}/H_{sp}$) 为 0.039 6, 可见, 高达 96.04% 的遗传变异来自群体内。根据 Hardy-Weinberg 平衡假设计算黄海、渤海和养殖群体的预期杂合度 (H_e) 分别为 0.252 6、0.252 4 和 0.242 2, 3 个群体之间的遗传分化系数为 0.036 3, 源于群体间的遗传变异为 3.63%, 类似于采用 Shannon 多样性指数的测算值 (表 3)。基于 AFLP 和 RAPD 数据计算的 3 个群体的遗传相似度和遗传距离见表 4, 图 4 显示了这 3 个群体的 UPGMA 系统树。可见, RAPD 和 AFLP 的分析结果完全一致, 黄海群体遗传多样性最高, 渤

海群体其次, 养殖群体最低; 养殖群体同渤海群体亲缘关系较近。

2.3 Cyt b 基因序列分析

利用一对通用引物经过 PCR 扩增, 得到了半滑舌鲷线粒体 *Cyt b* 基因部分片段, 经比对除去引物, 得到序列为 402 bp 的片段, 在黄海、渤海两个群体共 37 个个体中, 共有 4 个变异位点, 无插入与缺失 (图 5); 37 个个体中共检测到 5 种单倍型 (H1, H2, H3, H4, H5), GenBank 登录号为: EF137920 ~ EF137924, 其中在渤海群体中只检测到单倍型 H1, 即渤海群体的 19 个个体序列完全一样, 在黄海群体中, 5 种单倍型都出现, 14 个个体共享单倍型 H1, 其余 4 种单倍型分别只在 1 个个体中出现。渤海群体的单倍型多样性指数及核苷酸多样性指数都为 0, 黄海群体为 0.041、0.001。两个群体间的核苷酸差异数为 0~1, 渤海群体内的核苷酸差异数为 0, 黄海

群体内的核苷酸差异数为 0~1,在检测到的 5 种单倍型两两之间只有 1 个碱基的差异(图 5)。可以看出,两个群体遗传主体单倍型相同,主体单倍型 H1 在黄海、渤海群体中占的比例为 77.78% 和 100%, AMOVA 分析显示两群体的 F_{st} 值为 0.31%, 即只有 0.31% 的变异来源于群体间,而 99.69% 的变异来源于群体内,两群体间遗传差异不显著;但黄海群体遗传多样性高于渤海群体,渤海群体遗传多样性较贫乏。

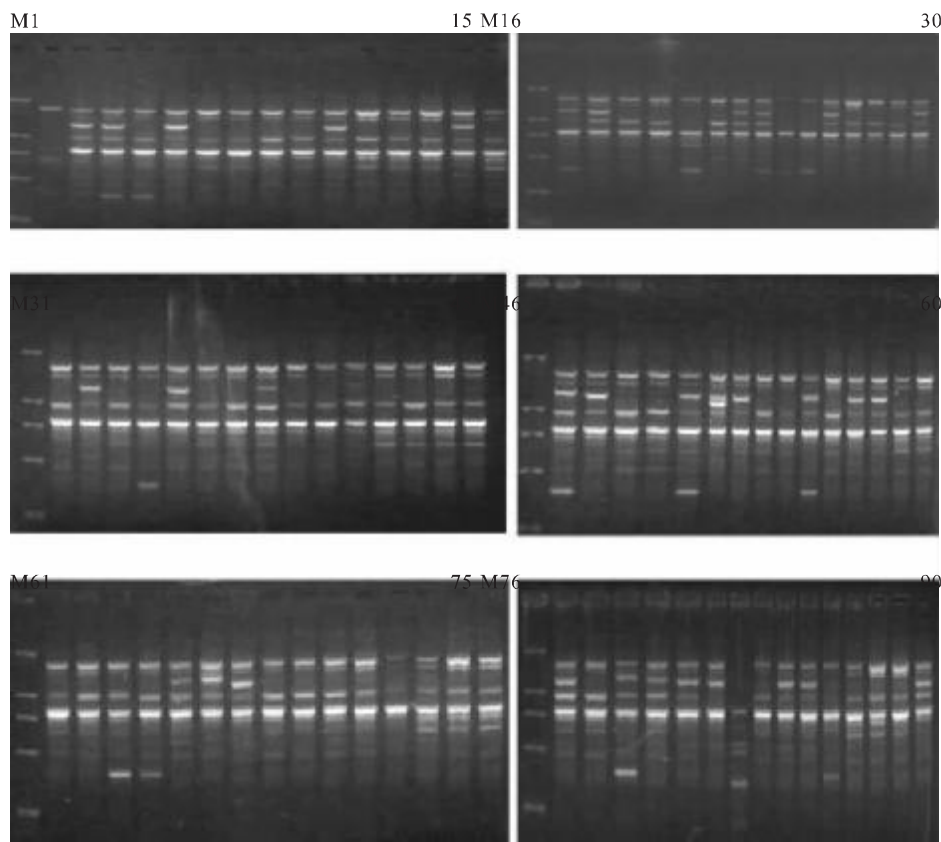


图 3 引物 S98 对半滑舌鲷群体的扩增图谱
M:DL2000;1~30 为黄海群体;31~60 为渤海群体;61~90 为养殖群体
Fig.3 Amplification of genomic DNA from three populations of *C. semilaevis* with primer S98
M: DL2000; 1 – 30: Yellow Sea population; 31 – 60: Bohai Sea population; 61 – 90: Cultured population

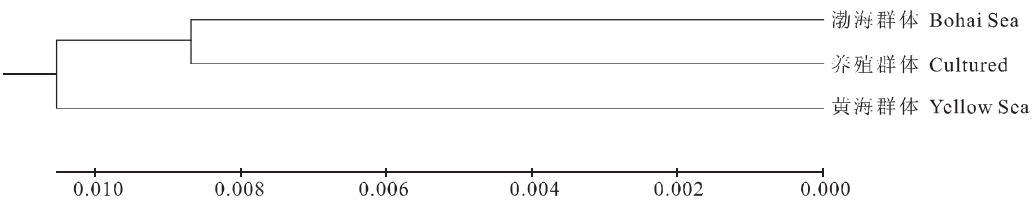


图 4 根据 RAPD 计算的遗传距离,用 UPGMA 方法构建的 3 个群体半滑舌鲷的 UPGMA 系统树
Fig.4 UPGMA dendrogram of the three populations of *C. semilaevis* based on RAPD data

H1	ACA	AGA	ACT	TAA	TGG	TGA	GCT	TAC	GTA	AAT	CAC	ACC	CCA	TTT	TAA	AAA	TCG	TAA	ATG	ATG	[60]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
H3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
H4	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
H5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[60]
H1	CAC	TAA	TTG	ATC	TTC	CCG	CCC	CAA	CAA	ACA	TCT	CAA	CCT	GAT	GAA	ATT	TTG	GAT	CCC	TCT	[120]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
H3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
H4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
H5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[120]
H1	TAG	GAC	TAT	GCT	TAG	GAG	TCC	AAA	TCA	TTA	CAG	GAC	TTT	TCT	TAG	CTA	TAC	ACT	ATA	CTG	[180]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
H3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
H4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
H5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[180]
H1	CAG	ATA	TTT	CAA	TAG	CAT	TCT	CTT	CCG	TCA	CTC	ATA	TTT	GCC	GAG	ACG	TAA	ATT	ACG	GCT	[240]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
H3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
H4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
H5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[240]
H1	GAT	TAA	TCC	GCA	ATT	TAC	ACG	CTA	ACG	GCG	CCT	CAT	TTT	TCT	TTA	TTT	GCA	TTT	ATC	TCC	[300]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
H3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
H4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
H5	...	...	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[300]
H1	ACA	TCG	GTC	GAG	GAC	TTT	ACT	ACG	GCT	CCT	ACC	TGT	ACA	AAG	AAA	CTT	GAA	ATA	CAG	GAG	[360]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[360]
H3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[360]
H4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[360]
H5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[360]
H1	TTA	TAT	TGT	TAC	TAT	TAG	TCA	TAG	CCA	CTG	CTT	TCG	TTG	GCT							[402]
H2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...							[402]
H3	...	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...							[402]
H4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...							[402]
H5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...							[402]

图5 半滑舌鲷群体 $C_{yt}b$ 基因5种单倍型序列(H1~H5)的比对Fig.5 Sequence comparison of $C_{yt}b$ gene among five haplotypes (H1 - H5) in *C. semilaevis*

3 讨论

本研究采用3种分子标记对半滑舌鲷群体遗传多样性进行了研究,AFLP和RAPD分析的结果显示黄海群体的遗传多样性比渤海群体丰富,野生群体的遗传多样性比养殖群体丰富。线粒体 $C_{yt}b$ 基因序列的分析也显示黄海群体的遗传多样性比渤海群体丰富。本实验用半滑舌鲷养殖群体是渤海野生群体的子一代,根据AFLP分析的结果,养殖群体扩增出的位点数小于渤海野生群体,多态位点比例、预期杂合度和Shannon指数也小于野生群体;RAPD的结果同AFLP分析的结果基本一致。半滑舌鲷养殖群体遗传多样性低于野生群体,可能是由于养殖群体的亲本数量较少,由于遗传漂变,使一些低频率位点丧失,隐性纯合位点数增加,使养殖群体的遗传多样性降低。张全启等利用AFLP标记对牙鲆野生群体和野

生群体的人工繁殖的子一代进行了遗传多样性的研究,发现养殖群体的扩增位点数、多态位点比例、Shannon指数及预期杂和度都小于野生群体^[25]。王志勇等^[24]利用AFLP标记对福建官井洋大黄鱼1个野生群体和2个养殖群体遗传多样性进行了研究,表明养殖群体的多态位点比例和个体间遗传差异度都小于野生群体,养殖群体遗传多样性相对贫乏。3种标记都显示黄海群体遗传多样性大于渤海群体,这可能由于渤海较黄海封闭水域面积小,并且捕捞压力大,更容易形成遗传瓶颈,丧失稀有位点或稀有单倍型。本实验AFLP数据得到的半滑舌鲷群体的多态位点比例(40.2%~49.8%)低于大黄鱼野生群体(76.6%)、养殖群体(69.2%~70.6%)^[24],同中国沿海真鲷3个群体的多态位点比例(58.4%、60.3%、64%)相比也较低^[23],同牙鲆野生群体(46.18%)、养殖群体(40.07%)的多态位点比例差不多^[25]。通过横

向比较其他鱼类由 RAPD 数据计算得到的多态位点比例数据发现,半滑舌鳎群体(74.0%~80.0%)低于小黄鱼的野生群体(91.03%)^[32],也低于梭鱼的野生群体(85.71%)和养殖群体(83.93%)^[33],高于中华鲟(11%)^[34]、大弹涂鱼(21%)^[35]。可见半滑舌鳎群体的遗传多样性相对贫乏,这可能由于半滑舌鳎自然种群数量比较少,亲体繁殖力比较弱,活动范围比较小以及近亲繁殖有关。

在 AFLP 和 RAPD 分析中,未发现 3 个群体的特异性条带作为鉴别种群的标记;在 *Cyt b* 基因序列中也未发现黄海和渤海群体有固定变异的位点。通过比较 $G_{st}/H_{pop}/H_{sp}$,并根据 AMOVA 计算 F_{st} , 3 种分子标记对半滑舌鳎群体间遗传变异占总体变异的估算, AFLP 标记对群体间遗传差异的检测最为灵敏(14.28%~16.04%), RAPD 标记次之(3.63%~3.96%),而 *Cyt b* 基因灵敏度最差(0.31%)。造成这种现象的原因可能由于 *Cyt b* 基因序列分析是对这单一基因位点的分析并且 *Cyt b* 基因是蛋白质编码基因,进化速率受到限制,而 AFLP 和 RAPD 标记是对整个基因组多个基因位点遗传变异信息的扫描,这可能导致了 AFLP 和 RAPD 标记对半滑舌鳎群体间的遗传差异反应较 *Cyt b* 基因灵敏。根据本研究结果,由 AFLP 数据计算的 3 个群体的遗传距离在 0.084 3~0.093 6 之间,而 RAPD 数据计算的群体间遗传距离在 0.017 3~0.023 7 之间,这也显示了 AFLP 标记比 RAPD 标记对于群体间遗传变异检测更为灵敏,这与其他物种的遗传多样性分析的结论是一致的^[36-37], AFLP 是一种理想的检测群体遗传多样性的分子标记。

本研究利用 3 种分子标记对半滑舌鳎群体遗传多样性进行了分析,并比较了 3 种分子标记在半滑舌鳎群体遗传变异中的灵敏度,显示 AFLP 标记灵敏度最高,但 AFLP 标记是显性分子标记,不能区分杂合和纯合位点,在群体遗传结构分析方面有一定局限性,有必要运用其他共显性分子标记对半滑舌鳎群体遗传变异进行深入的研究。

参考文献:

- [1] 李思忠,王惠民.中国动物志:硬骨鱼纲鲈形目[M].北京:科学出版社,1995:334-366.
- [2] 邓景耀,孟田湘,任胜民.渤海鱼类种类组成及数量分布[J].海洋水产研究,1988,(9):10-98.
- [3] 姜言伟,万瑞景.渤海半滑舌鳎的生殖习性及其产卵生态的研究[J].海洋水产研究,1988(9):185-192.
- [4] 姜言伟,万瑞景.渤海半滑舌鳎早期形态及发育特征的研究[J].海洋水产研究,1988(9):193-201.
- [5] 孟田湘,任胜民.渤海半滑舌鳎的年龄与生长[J].海洋水产研究,1988(9):173-183.
- [6] 窦硕增,杨纪明.渤海南部半滑舌鳎的食性和摄食的季节性变化[J].生态学报,1992,12(4):368-376.
- [7] 姜言伟,万瑞景,陈瑞盛,等.渤海半滑舌鳎人工育苗工艺技术的研究[J].海洋水产研究,1993,(14):25-33.
- [8] 郑忠明,倪海儿.东海半滑舌鳎生长与形态参数的研究[J].宁波大学学报,2000,(2):21-24.
- [9] 王资生,黄金田,彭斌.半滑舌鳎生存临界盐度与适宜生长盐度[J].现代渔业信息,2003,18(12):17-19.
- [10] 万瑞景,姜言伟,庄志猛.半滑舌鳎早期形态及发育特征[J].动物学报,2004,50(1):91-102.
- [11] 杜伟,蒙子宁,薛志勇,等.半滑舌鳎胚胎发育及其与水温的关系[J].中国水产科学,2004,11(1):48-53.
- [12] 柳学周,徐永江,马爱军,等.温度、盐度、光照对半滑舌鳎胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究[J].海洋水产研究,2004,25(6):1-6.
- [13] 马爱军,柳学周,徐永江,等.半滑舌鳎早期发育阶段的摄食特性及生长研究[J].海洋与湖沼,2005,36(2):130-138.
- [14] 周丽青,杨爱国,柳学周,等.半滑舌鳎染色体核型分析[J].水产学报,2005,29(3):417-419.
- [15] 邱芳,伏健民,金德敏,等.遗传多样性的分子检测[J].生物多样性,1998,6(2):143-150.
- [16] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38: 201-210.
- [17] 陈清华,肖调义,刘臻. AFLP 技术在水产动物研究中的应用[J].大连水产学院学报,2005,20(1):69-72.
- [18] 潘洁,包振民,赵洋,等.栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性分析[J].高技术通讯,2002,12:78-82.
- [19] 张雯,刘晓,张国范.利用 AFLP 技术研究海湾扇贝不同养殖群体的遗传结构及其分化[J].高技术通讯,2005,15(4):84-88.
- [20] 陈省平,包振民,潘洁,等.4 种养殖扇贝的群体遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究[J].海洋学报,2005,27(2):160-164.
- [21] 王伟继,高煥,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.
- [22] 岳志芹,王伟继,孔杰,等.用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异[J].水产学报,2005,29(1):13-19.
- [23] 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[J].水产学报,2001,25(4):289-294.
- [24] 王志勇,王艺磊,林利民,等.福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态的研究[J].中国水产科学,2002,9(3):198-202.
- [25] 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.
- [26] 张俊彬,黄良民,陈真然. AFLP 技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究[J].海洋学报,2005,27(2):165-171.
- [27] 刘必谦,董闻琪,王亚军,等.岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析

- [J].水生生物学报, 2005, 29 (4): 414–416.
- [28] Hochachka M. Biochemistry and molecular biology of fishes [M]. London: Elsevier Science Publishers. 1993, 2: 1–38.
- [29] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995, 23 (21): 4 407.
- [30] Wang Z Y, Tsoi K H, Chu K H. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp [J]. Biochem System Ecol. 2004, 32 (4): 399–407.
- [31] Williams J K G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6 531–6 535.
- [32] 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, 2003, 11 (3): 197–203.
- [33] 权洁霞, 戴继勋, 沈颂东, 等. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析 [J]. 海洋学报, 2000, 22 (5): 82–87.
- [34] 张四明, 邓怀, 晏勇. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究 [J]. 海洋与湖沼, 2000, 31 (1): 1–7.
- [35] 金春华, 钟爱华, 黄福勇, 等. 大弹涂鱼自然种群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 海洋科学, 2004, 28 (12): 26–30.
- [36] 杨东, 余来宁. RAPD 和 AFLP 在分析尼罗罗非鱼遗传多样性研究中的应用比较 [J]. 江西农业学报, 2006, 2: 1–4.
- [37] 王玲玲, 宋林生, 李红蕾, 等. AFLP 和 RAPD 标记技术在栉孔扇贝遗传多样性研究中的应用比较 [J]. 动物学杂志, 2003, 4: 35–39.

Genetic diversity in *Cynoglossus semilaevis* by AFLP, RAPD and mtDNA markers

HAN Zhi-qiang^{1,2}, ZHUANG Zhi-meng¹, GAO Tian-xiang², LIU Jin-xian², LI Yu-hui², WANG Zhi-yong³, TANG Qi-sheng¹

(1. Key Laboratory for sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Cynoglossus semilaevis* is a commercially important marine fish species, which is widely distributed in the Yellow Sea and the Bohai Sea. *C. semilaevis* has been intensively studied in China, including its basic biological characteristics and artificial reproduction. However, very few studies on *C. semilaevis* were focused on genetic diversity, which has become an obstacle to further researches on the protection, management, rational exploitation and sustainable utilization of *C. semilaevis* resources. The information of genetic diversities in different populations will give us theoretical guidance in breeding and genetic improvement. In this study, three molecular markers including AFLP, RAPD and the mitochondrial cytochrome b gene sequencing techniques were used to analyze the genetic diversity and variation of three populations of *C. semilaevis*. The genetic diversity in *C. semilaevis* was detected by five selective primer pairs and 18 random primers. The AFLP and RAPD analysis results indicated that the genetic diversity in the Yellow Sea population is higher than that in the Bohai Sea population and the genetic diversity in cultured population is the lowest among these three populations. Shannon index and G_{st} suggested that the partition of genetic variation be mainly distributed within populations. Compared with other species, populations of *C. semilaevis* presented relatively low genetic diversity. As detected by cytochrome b sequencing, a total of five haplotypes were found in 37 individuals from the Yellow Sea and the Bohai Sea populations. There were five haplotypes (H1, H2, H3, H4 and H5) in the Yellow Sea population, but only one haplotype (H1) in the Bohai Sea population. However, to significant genetic differentiation between these two populations was detected based on *Cyt b* gene. According to the results, it can be concluded that AFLP is one of the useful molecular markers to detect genetic diversities. However, AFLP markers are inherited as dominant markers, further studies in terms of utilizing co-dominant markers are needed for a better understanding of the genetic diversity in this species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 192–200]

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; genetic diversity; AFLP; RAPD; Cytochrome b

Corresponding author: ZHUANG Zhi-meng. E-mail: zhuangzm@ysfri. ac. cn