

文章编号: 1674-5566(2010)01-0019-05

## 乌苏里江流域尖吻细鳞鲑及钝吻细鳞鲑 群体遗传多样性分析

王 荻, 徐革锋, 刘 洋, 卢彤岩, 牟振波

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘 要:**采用扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 技术对乌苏里江尖吻和钝吻两种形态的细鳞鲑各 10 个个体进行了遗传多样性分析。结果显示, 12 对选择性扩增引物共扩增得到 433 个位点, 其中多态性位点 322 个, 多态性百分比为 74.36%。且在 12 对选择性扩增引物中, 引物 B<sup>3</sup> 的聚丙烯电泳图谱显示, 在 130 bp 和 136 bp 处, 钝吻群体有两条特异性扩增条带产生。对 2 个群体的 Shannon 多样性指数, Nei 氏基因多样性等各项参数进行了相关分析。尖吻和钝吻细鳞鲑个体 UPGMA 聚类树分为两个明显的大分支, 群体的遗传相似度为 0.836 7, 遗传距离为 0.178 3, 而钝吻细鳞鲑的各项多样性指数均略高于尖吻细鳞鲑。

**关键词:**尖吻细鳞鲑; 钝吻细鳞鲑; AFLP; 遗传多样性

**中图分类号:** Q 953, S 917 **文献标识码:** A

## Assessing genetic diversity of the *Brachymystax lenok* and *Brachymystax tumensis* populations in Ussuri River

WANG Di XU Ge-feng LIU Yang LU Tong-yan MOU Zhen-bo

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Science Harbin 150070, China)

**Abstract:** Lenok (*Brachymystax lenok*), which was a kind of Chinese famous endemic fish, had undergone a dramatic decline for the impacts of human and environment. In this paper, the genetic diversity of the twenty individuals of *B. lenok* and *B. tumensis* populations which from the Ussuri River were analyzed using the AFLP method. In total, 322 polymorphic loci of 433 were amplified with 12 primer pairs and the percentage of polymorphic loci was 74.36%. In the 130 and 136 bp, there were two differential bands of the *B. tumensis*' PAGE with the B<sup>3</sup> primer. The Shannon information index of the *B. lenok* and *B. tumensis* populations was  $0.1985 \pm 0.2874$  and  $0.3631 \pm 0.3069$ . And the Nei's gene diversity index was  $0.1364 \pm 0.2011$  and  $0.2510 \pm 0.2157$ . The average  $H_t$  was  $0.2604 \pm 0.0343$  and  $H_s$  was  $0.1937 \pm 0.0248$ . Among the two populations, the average genetic distance ( $D_{st}$ ) was 0.066 7. The gene differentiation coefficient ( $G_{st}$ ) of 0.256 1 indicated that there was genetic differentiation of a certain degree among the populations. The genetic diversity was 74.39% within population and 25.61% among the population. The gene flow index ( $N_m$ ) was 1.452 1. The AMOVA analysis indicated that the average  $F_{st}$  was

收稿日期: 2009-04-27

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD03B08-3); 黑龙江省科技攻关项目 (GA06B203-4)

作者简介: 王 荻 (1980-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物医学方面的研究。E-mail: wangdi\_12@yahoo.com.cn

通讯作者: 牟振波, E-mail: mouzhenbo@163.com

0.330 84. And 33.08% of variance was among populations and 66.92% within populations. The *B. lenok* and *B. tumensis* populations clustered two branches with the UPGMA method. And the genetic similarity was 0.836 7, the genetic distance was 0.178 3. The *B. tumensis* group showed a higher polymorphism ratio to the *B. lenok* group.

**Key words:** *Brachymystax lenok*; *Brachymystax tumensis*; AFLP; genetic diversity

细鳞鲑属 (*Brachymystax*) 鱼类隶属于鲑形目 (*Salmoniformes*) 鲑科 (*Salmonidae*), 主要分布于亚洲东北部的广大区域<sup>[1]</sup>, 是我国北方一种重要的经济鱼类<sup>[2]</sup>。自 1866 年 Gunther 确定细鳞鲑属以来, 多数学者认为细鳞鲑属的鱼类在中国只有尖吻细鳞鲑 (*Brachymystax lenok*) 一种<sup>[3-7]</sup>, 但是, 随着水产科学研究人员对细鳞鲑的分布及分类研究的逐渐深入, 近些年, 对细鳞鲑属鱼类的分类问题开始出现争议。20 世纪 60 年代开始的细鳞鲑分类学研究多见于形态学、生态学等方面<sup>[1, 8-9]</sup>。随着分子手段的不断发展, 越来越多的分子生物学技术开始应用于辅助细鳞鲑鱼类的分类研究上<sup>[10-11]</sup>。本文拟采用 AFLP 技术, 进一步从基因水平上对乌苏里江尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑 (*Brachymystax tumensis*) 2 种形态细鳞鲑的遗传多样性及亲缘关系进行比较研究, 以期对 2 种细鳞鲑的分类地位、起源进化及其种质资源保护提供一定的科学数据及理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及基因组 DNA 的提取

实验用细鳞鲑群体样本, 均采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类实验站, 为野生捕捞的亲本群体。各随机选取 10 个个体, 按照《分子克隆 (第三版)》<sup>[12]</sup>经典的酚-氯仿提取法, 提取组织中总 DNA。经紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 波长下测定其浓度和纯度后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。按比例将 DNA 稀释至 100 ng/ $\mu$ L 储存于 -20℃ 备用。

### 1.2 AFLP 分析方法

参照 Vos 等<sup>[13]</sup>的方法, 实验用限制性内切酶均购自 promega 公司, 所有引物由上海生工生物有限公司合成。

#### 1.2.1 基因组 DNA 双酶切及接头的制备、连接

用限制性内切酶 *EcoR* I (切点 G/AATTC) 和 *Tm*<sup>9</sup> I (切点 T/TAA) 组合对样本基因组 DNA 进

行酶切。

用单链寡核苷酸制备接头 (接头序列见表 1), 混合每两组寡核苷酸, 使 *EcoR* I 接头终浓度为 5 pmol/ $\mu$ L, *Tm*<sup>9</sup> I 接头终浓度为 50 pmol/ $\mu$ L。95℃ 变性 10 min, 然后经过 4 h 缓慢冷却至 10℃, 最终形成双链接头。

建立 20  $\mu$ L 的连接体系, 其中包含 5  $\mu$ L 酶切片, 1  $\mu$ L *EcoR* I 接头, 1  $\mu$ L *Tm*<sup>9</sup> I 接头, 6  $\mu$ L *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 (MBI USA), 于 22℃ 水浴中连接 4 h。

#### 1.2.2 PCR 扩增

双酶切组合的预扩增引物为: E+A (5'-GAC TGC GTA CCA ATT C+A-3') 和 T+C (5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+C-3'), 预扩增 PCR 反应体系如下: 模板为 3  $\mu$ L 连接产物, 引物各 1  $\mu$ L, 10×Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L Taq 聚合酶 0.3  $\mu$ L, 无菌超纯水补足至 25  $\mu$ L。预扩增 PCR 反应程序为 72℃ 2 min; 94℃ 2 min; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

从 64 对 AFLP 选择性扩增引物中, 选择了 12 对扩增条带数目适中、清晰、多态性较高的引物进行实验分析。*EcoR* I 引物用字母 A 到 F 进行编号, 而 *Tm*<sup>9</sup> I 引物用数字 1 到 4 进行编号。每对引物组合都由一个字母加一个数字组成 (例如: E-AGC/M-CAC 标记为引物 A1)。选择性扩增引物序列见表 1, 实验所用引物对分别为 A1, B1, B3, C1, C3, D1, D4, E1, E4, F1, F2, F3。

建立 25  $\mu$ L 反应体系, 其中模版为 3  $\mu$ L 预扩增产物, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 10×Buffer 2.5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L Taq 聚合酶 0.3  $\mu$ L, 无菌超纯水补足 25  $\mu$ L。反应条件为 72℃ 2 min, 94℃ 2 min; 94℃ 30 s 退火 30 s, 72℃ 90 s, 13 个循环, 每个循环的退火温度从 65 开始逐次降 0.7℃ 至 55.9℃; 然后, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

表 1 用于 AFLP分析的接头和引物序列  
Tab. 1 The sequences of adaptor and primer for AFLP analysis

内切酶	接头序列 (5'-3')	选择性扩增引物序列 (5'-3')
EcoR I	CTC GTA GAC TGC GTA CC AAT TGG TAC GCA GTC TAC	EA: GAC TGC GTA CCA ATT CAG C
		EB: GAC TGC GTA CCA ATT CAA G
		EC: GAC TGC GTA CCA ATT CAG G
		ED: GAC TGC GTA CCA ATT CAC G
		EE: GAC TGC GTA CCA ATT CAC C
		EF: GAC TGC GTA CCA ATT CAA C
Tm <sup>9</sup> I	GAC GAT GAG TCC TGA G TAC TCA GGA CTC AT	T1: GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
		T2: GAT GAG TCC TGA GTA ACT T
		T3: GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
		T4: GAT GAG TCC TGA GTA ACA T

### 1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

扩增产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺 (丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺体积比为 29:1) 凝胶电泳 16~20 h (180V), 银染, 扫描仪成像待分析。

### 1.3 数据分析

采用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析获得的 AFLP 电泳图谱, 按电泳图上条带的有无, 转化为 0, 1 矩阵, 统计位点总数和多态性位点比例。假设群体处于 Hardy-Weinberg 平衡, 利用 Popgene 3.2<sup>[14]</sup> 版软件计算有效等位基因, Nei 氏基因多样性指数和 Shannon 氏指数。利用公式  $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ <sup>[15]</sup> 计算个体之间的遗传相似性系数 ( $N_{xy}$  为 x 个体和 y 个体所共有的位点数目,  $N_x$ 、 $N_y$  分别为 x 个体和 y 个体所具有的位点数目), 用公式  $D = 1 - S$  计算个体之间的遗传距离, 得到个体间的遗传距离矩阵。用 Phlip 3.6 软件计算遗传距离, 并进行 1 000 次 bootstrap 检验, 再由 MEGA3 软件绘制系统树。采用分子方差分析 (AMOVA) 方法, 对群体内及群体间的基因多样性, 基因流系数  $N_m$ , 平均遗传分化系数  $F_{st}$  及其变异来源进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 扩增多态性

12 对选择性扩增引物组合在 2 个群体中共扩增得到 433 个位点, 其中多态性位点 322 个, 多态性位点比例为 74.36%。各引物组合所扩增的位点数有一定差异, 扩增平均位点数为 47 个, 其中 A1 (E-AGC/T-CAC) 扩增位点数最少, 为 30 个; 而 C4 (E-AGG/T-CAT) 扩增位点数最多, 为 49 个, 扩增片段主要分布于 100~600 bp 之间。而

扩增的多态性位点数差异较大 ( $P < 0.05$ ), 平均为 36 个, 多态性片段主要分布在 100~400 bp。

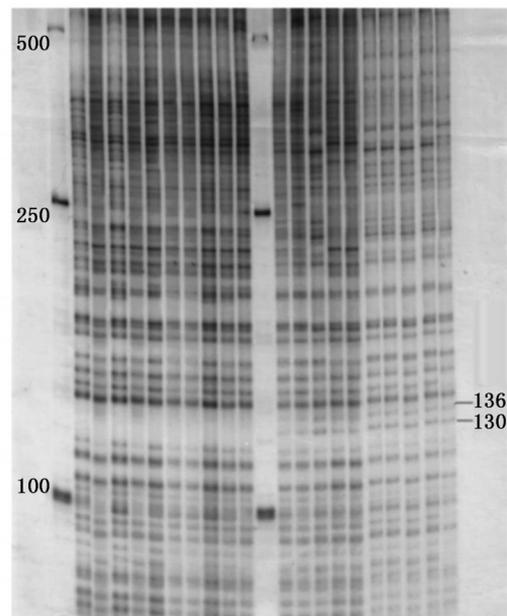


图 1 引物 B3 的聚丙烯电泳图谱

Fig 1 The PAGE electrophoregram of primer B3

尖吻细鳞鲑群体与钝吻细鳞鲑群体的多态性位点数与多态位点百分比相差较大, 其中尖吻群体的多态性位点为 147 个, 多态性位点百分比为 33.95%; 而钝吻群体的多态性位点为 258 个, 多态性百分比为 59.58%。在 12 对选择性扩增引物中, 引物 B3 (E-AAG/M-CTG) 的聚丙烯电泳图谱显示, 在 130 bp 和 136 bp 处, 钝吻细鳞鲑群体有两条特异性扩增条带产生, 而尖吻细鳞鲑群体没有。

### 2.2 各群体遗传结构及遗传多样性分析

将 0/1 矩阵输入 Popgene 3.2 软件进行分析, 得到各群体扩增数据的比较结果见表 2。

表 2 尖吻细鳞鲑与钝吻细鳞鲑群体的遗传结构

Tab. 2 The genetic construction of *B. lenok* and *B. tumensis* populations

种名	平均等位基因数目 na	平均有效等位基因数 ne	平均基因多样性 (杂合度)h	平均香农熵 I
尖吻细鳞鲑	1.339 5±0.474 1	1.244 2±0.373 5	0.136 4±0.201 1	0.198 5±0.287 4
钝吻细鳞鲑	1.595 8±0.491 3	1.450 6±0.405 1	0.251 0±0.215 7	0.363 1±0.306 9

由表中数据可以看出,钝吻细鳞鲑群体,在平均等位基因数  $na$  平均有效等位基因  $ne$  Nei氏基因多样性  $h$  和香农熵  $I$  与多态位点比率各项统计参数上均高于尖吻细鳞鲑群体,且两个群体的  $I$  值均大于  $h$  值。

用 Nei氏分子遗传学进化方法<sup>[16]</sup>对不同种源遗传变异分析表明,两个群体的 Nei's 总基因多样性  $H_t$  为  $0.260 4 \pm 0.034 3$ ; 群体内基因多样性  $H_s$  为  $0.193 7 \pm 0.024 8$ ; 群体间的基因多样性  $D_{st}$  ( $D_{st} = H_t - H_s$ ) 为  $0.066 7$ 。基因分化系数  $G_{st}$  ( $G_{st} = D_{st} / H_t$ ) 为  $0.256 1$ , 群体内的基因多样性占总群体的  $74.39\%$ , 群体间基因多样性占总群体的基因多样性的  $25.61\%$ 。而基因流系数  $N_m$  为  $1.452 1$ , 表明各群体间存在较高的基因流动。

### 2.3 群体间遗传相似度及遗传距离分析

经计算<sup>[17]</sup>可知,尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑群体的遗传相似度 ( $I$ ) 为  $0.836 7$ , 而遗传距离 ( $D$ ) 为  $0.178 3$ 。

将 Popgen32 软件根据 Nei's 生成的遗传距离数据带入 MEGA 软件, 利用 UPGMA 法构建的群体遗传关系聚类图如图 2 所示。

由图 2 可以看出,尖吻细鳞鲑 (图中以  $L_n$  标记) 和钝吻细鳞鲑 (图中以  $T_n$  标记) 群体分别聚类为一个单独的分支, 聚类分支内偶有遗传距离稍远的个体, 但没有出现混入其他聚类分支的异常个体。而尖吻细鳞鲑分支内又分为两个较大的亚分支。

### 2.4 群体间遗传多样性来源的分子方差 (AMOVA) 分析

应用分子方差分析 (AMOVA)<sup>[18]</sup> 对 2 个群体的遗传多样性来源分析表明:  $33.08\%$  的变异来自于群体间, 而群体内的变异占  $66.92\%$ 。

2 个群体的平均遗传分化系数  $F_{st}$  为  $0.330 84$ 。其中尖吻细鳞鲑群体的  $F_{st}$  为  $0.351 60$ , 稍大于钝吻细鳞鲑群体的  $0.300 08$ 。

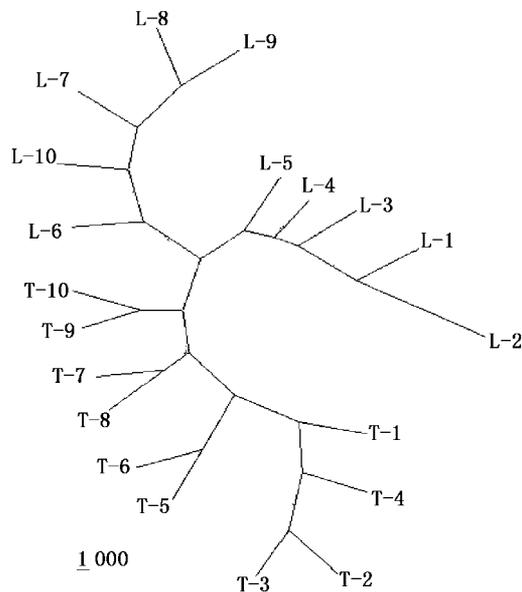


图 2 根据遗传距离绘制的尖吻细鳞鲑及钝吻细鳞鲑的 20 个个体 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Individuals clustering of *Brachymystax lenok* and *Brachymystax tumensis* by UPGMA method according to their genetic distances

注: 尖吻细鳞鲑标记为 L 钝吻细鳞鲑标记为 T。

## 3 讨论

### 3.1 群体遗传多样性分析

目前, 分子标记技术常被用于研究物种的群体遗传多样性, 本实验采用 AFLP 方法, 对乌苏里江尖吻细鳞鲑、钝吻细鳞鲑群体的遗传差异及遗传多样性进行了分析, 结果表明, 两个群体的多态性位点百分比较高, 而与尖吻细鳞鲑相比, 钝吻细鳞鲑表现出更高的遗传多样性水平。

乌苏里江尖吻和钝吻细鳞鲑的平均杂合度  $h$  值和有效等位基因数  $ne$  值都表现出丰富的遗传多样性水平, 但是尖吻细鳞鲑的遗传多样性水平略低于钝吻细鳞鲑, 与马波等<sup>[11]</sup> 用微卫星方法对乌苏里江尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑的研究结果相符。

### 3.2 群体间的亲缘关系比较

马波等通过微卫星方面研究指出:尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑在群体遗传多样性上差异显著,亲缘关系很远,物种间可能存在生殖隔离,遗传分化程度远达到种以上的分类水平<sup>[11]</sup>。而本文研究的乌苏里江尖吻及钝吻细鳞鲑野生群体之间遗传相似度  $I = 0.8367$  ( $D_s = 0.1783$ )表明乌苏里江的尖吻细鳞鲑及钝吻细鳞鲑有较丰富的遗传多样性水平,且引物对 B3的扩增图谱中,在 130 bp和 136 bp处,钝吻细鳞鲑有两条清晰的扩增产物条带,而尖吻细鳞鲑在这个片段大小没有扩增产物产生。这两个分子标记,可以用来作为乌苏里江尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑的区分标记。在个体聚类图中也可以清楚的看到,尖吻细鳞鲑及钝吻细鳞鲑聚类为两个明显分支,互不干扰,应为两个明显分化群体。

### 3.3 遗传结构与基因流

用 Nei氏分子遗传学进化方法对不同种源遗传变异进行分析时,群体内基因多样性  $H_s$  大于群体间的基因多样性  $D_{st}$ ,表明群体内具有较高的基因多样性,遗传变异多来源于群体内,只有较少部分存在于群体间,Nei氏遗传多样性分析方法与分子方差分析(AMOVA)得出的结论一致,群体内遗传变异(66.92%)远远大于群体间(33.08%)。这样的结果也许与马波等报道的尖吻细鳞鲑及钝吻细鳞鲑之间存在一定的生殖隔离有关。具体数据与证据还需要进一步实验来获取。

本实验研究的乌苏里江的尖吻细鳞鲑和钝吻细鳞鲑群体间的基因流系数  $N_m$  为 1.4521,根据 Wright等对群体基因流系数  $N_m$  的说明<sup>[19]</sup>,两个群体间存在一定的基因流动,也存在一定程度的遗传分化(基因分化系数  $G_{st}$  为 0.2561)。

### 3.4 遗传多样性保护

本文研究结果表明我国乌苏里江流域尖吻和钝吻两种形态的细鳞鲑群体具有较高的群体遗传多样性。随着群体数量日益减少及人工养殖的逐渐推广,在以提高群体数量为目的而进行的人工繁殖过程中,不同区域的个体,不同形态的个体之间进行异位杂交将严重降低群体的适应潜能,而且也将改变这些地理群体的独特进化轨迹<sup>[10]</sup>,应该注意对尖吻和钝吻两种形态的细鳞鲑的分别保护。

### 参考文献:

- [1] 马波,尹家胜,李景鹏. 黑龙江流域两种细鳞鲑的形态学比较及其分类地位初探[J]. 动物分类学报, 2005, 30(2): 257-260.
- [2] 齐子鑫,赵永军. 细鳞鲑的生物学及养殖前景展望. 郑州牧业工程高等专科学校学报[J]. 2006, 26(1): 29-30.
- [3] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 52-55.
- [4] 黄浩明,张德龙. 鸭绿江细鳞鱼的生物学[J]. 水生生物学报, 1989, 13(2): 160-168.
- [5] 秦树臻,王所安. 细鳞鱼亚种问题的研究[J]. 鲑鳟渔业, 1989, 2(1): 52-60.
- [6] 任幕莲,郭炎,张人铭. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2002: 63-67.
- [7] 王鸿媛. 细鳞鱼属的研究和河北北部的细鳞鱼[J]. 鲑鳟渔业, 1988, 1(1): 16-25.
- [8] 李思忠. 陕西太白山细鳞鲑的一新亚种[J]. 动物分类学报, 1966, 3(1): 92-94.
- [9] 牟振波,刘伟,徐革锋. 乌苏里江二种细鳞鱼生物学比较研究[J]. 水产学杂志, 2006, 19(2): 1-8.
- [10] 夏颖哲,盛岩,陈宜瑜. 利用线粒体 DNA控制区序列分析细鳞鲑种群的遗传结构[J]. 生物多样性, 2006, 14(1): 48-54.
- [11] 马波,姜作发. 乌苏里江 2种细鳞鲑种群遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 39-45.
- [12] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2002.
- [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [14] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian Journal of Botany, 1995, 129: 157.
- [15] 刘必谦,董闻琦,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): 413-416.
- [16] Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. Columbia University Press, New York, 1987: 187-192.
- [17] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Am Nat, 1972, 106: 283-292.
- [18] 张富民,葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD数据的 AMOVA分析[J]. 生物多样性, 2002, 10(4): 438-444.
- [19] Masatoshi N, Sudhir K. Molecular Evolution and Phylogenetics[M]. High Education Press, Beijing (in Chinese), 2002: 76-142.