

· 研究简报 ·

鲮原种群体的 AFLP 分析

叶卫¹, 符云¹, 朱彩艳², 夏军红²

(1. 广东鲮鱼原种场, 广东广州 511453; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要: 运用 AFLP 技术, 对广东鲮鱼原种场保存的鲮原种 2 个子群体 (子群体 h、q) 各 29 个个体进行遗传多样性分析。25 对 AFLP 引物组合中的 6 对引物扩增共产生 173 条条带, 其中多态位点数为 72, 多态位点比例为 41.5%。在 6 对引物产生的 173 条扩增条带中, 有一条扩增条带在子群体 h 中的出现频率远远高于其在子群体 q 中的出现频率 (72.4% > 20.6%), 编号为 E2M4-1。遗传多样性分析结果表明, 子群体 h 的遗传多样性指数高于子群体 q (0.1367 > 0.0998)。该研究为筛选鲮原种群体 2 个子群体间的特异性分子标记做了初步尝试。

关键词: 鲮; 扩增片段长度多态性; 遗传多样性

中图分类号: Q755

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2007)03-0057-04

AFLP analysis on original population of mud carp *Cirrhinus molitorella*

YE Wei¹, FU Yun¹, ZHU Caiyan², XIA Junhong²

(1. Original Species Field of *Cirrhinus molitorella* of Guangdong Province, Guangzhou, 511453, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510300, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique was applied to assess the genetic variations of the original population collected from Original Species Field of *Cirrhinus molitorella* in Guangdong Province. The studied samples contained sub-stock h and sub-stock q, 29 individuals respectively. Amplifications with 6 pairs of primers gave 173 reproducible and stable fragments, of which 72 were polymorphic. There was one band whose frequency was much higher in sub-stock h than that was in sub-stock q (72.4% > 20.6%). We named it as E2M4-1. Based on AFLP data, we found that the genetic diversity of sub-stock h was higher than sub-stock q (0.1367 > 0.0998). This study is a preliminary attempt for special molecular marker selecting of the two wild sub-stocks.

Key words: mud carp; *Cirrhinus molitorella*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic diversity

鲮 (*Cirrhinus molitorella*), 属鲤科 (Cyprinidae)、野鲮亚科 (Labeoninae), 是两广地区的四大家鱼 (鲮、草、鲢、鳊) 之一, 在广东省的淡水养殖业中占有重要的地位。四大家鱼繁殖成功以来, 普遍存在的近亲繁殖使得亲鱼性成熟提前、个体越变越小、鱼苗病害增多、生长减慢等问题出现^[1], 养殖群体遗传多样性下降。因此, 收集保存野生原种, 了解其遗传多样性状况并从中筛选出具有优良性状

的个体或群体进行苗种生产对于水产养殖业的持续稳定发展具有重要意义。

AFLP 技术首先由荷兰科学家 ZABEAU 和 VOS 提出^[2-3], 此项技术兼具了 RAPD 和 RFLP 的优点, 既有前者的简便灵敏和高效性也有后者的可靠性, 是迄今为止最有效的分子标记之一。广东鲮鱼原种场 2000 和 2003 年先后 2 次从西江流域肇庆段采捞野生鲮鱼苗, 作为鲮原种保存。

收稿日期: 2007-01-08; 修回日期: 2007-01-16

资助项目: 广东省自然科学基金 (033)

作者简介: 叶卫 (1958-); 男, 研究员, 从事水产遗传育种研究。E-mail: yewei195856@tom.com

饲养过程中发现该批鲮原种存在体色及生长速率差异。为了比较该批原种2个不同体色的子群体间的遗传差异,我们采用 AFLP 方法对其进行了研究。

1 材料

1.1 实验用鱼

2005年7月,从广东鲮鱼原种场取保种样品,对体色

不同的2个子群体(体色青, q; 体色淡黄, h)各取29尾,共58尾,分别编号为 q1~29、h1~29。剪尾鳍保存于95%的乙醇中,4h后更换1次95%的乙醇,保存用于总DNA 抽提。

1.2 AFLP 分析中使用的接头及引物序列

参照 VOS 等^[3]方法并稍作修改进行 AFLP 分析,研究中使用的接头及引物序列见表1。

表1 AFLP 分析的寡核苷酸接头和引物序列

Tab.1 The oligo nucleotide adaptors and primers used for the AFLP analysis

| 接头或引物 adaptor or Primer | | 序列 (5'→3') sequence (5'→3') |
|------------------------------------|------------------|--------------------------------|
| adaptor | <i>EcoRI</i> -1 | CTC GTA GAC TGC GTA CC |
| | <i>EcoRI</i> -2 | AAT TGG TAC GCA GTC TAC |
| | <i>MseI</i> -1 | GAC GAT GAG TCC TGA G |
| | <i>MseI</i> -2 | TAC TCA GGA CTC AT |
| primers of pre-amplification | <i>EcoRI</i> + 1 | GTA GAC TGC GTA CCA ATT CA |
| | <i>MseI</i> + 1 | GAC GAT GAG TCC TGA GTA AC |
| primers of selective amplification | E-NNN | GAC TGC GTA CCA ATT C NNN |
| | NNN | AAG, AGC, AGT, ATC, ACG |
| | M-NN (N) | GAT GAG TCC TGA GTA A NN (N) |
| | NN (N) | CAA, ACG, CTC, CAG, CGT |

注: 'E-NNN' 和 'M-NN (N)' 各自代表一条引物序列, 其中的一个 'N' 代表一个选择性碱基。'NNN' 为引物 'E-NNN' 的选择性碱基, 而 'NN (N)' 为引物 'M-NN (N)' 的选择性碱基

Note: 'E-NNN' and 'M-NN (N)' represented a primer sequence respectively, and an 'N' represented one selective nucleotide in the primer. 'NNN' was the selective nucleotides for the primer 'E-NNN', whereas 'NN (N)' for the primer 'M-NN (N)'.

2 方法

2.1 鲮总 DNA 的提取及定量

采用本实验室改进的 Tris-饱和酚法进行鲮总 DNA 抽提^[4]。在德国 Biometra 核酸定量仪上测定基因组 DNA 的吸光值, 测定核酸浓度。选取光密度 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间的基因组 DNA, 将其浓度稀释至 50 ng·μL⁻¹, -20℃ 保存备用。

2.2 总 DNA 的消化、连接、扩增

实验方法及操作过程参照夏军红^[5]博士论文并稍做修改进行。所做修改如下, 在 DNA 样品限制性消化中, DNA 用量为 250 ng, +1/+1 PCR 预扩增中, +1 引物用量为 100 ng, +3/+3 PCR 选择性扩增中, +3 引物用量为 150 ng。

2.3 PAGE 电泳

+3/+3 循环结束后, 1.5% Agrose 胶检测扩增结果。

等体积 2× 上样缓冲液终止反应, 点样, 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染法显色 (Premega 银染试剂盒操作说明), 数码相机拍照记录。

2.4 数据分析

银染之后得到的谱带应用软件 Labimage (Ver 2.6, by Kapelan) 分析, 相对于分子量标记 100 bp DNA ladder 确定等位基因大小。数据统计所有清晰可见的条带, 有带记为 1, 无带记为 0, 获得 0~1 矩阵。利用 Popgene (Ver. 3.1) 进行数据分析^[6]。

3 结果与分析

3.1 AFLP 引物筛选及扩增图谱

从 25 对 AFLP 引物组合 (表 1) 中选取 6 对扩增条带丰富、带型清晰、有差异性条带的 AFLP 引物用于进一步分析。引物组合为 E1M3、E1M4、E2M4、E4M3、E5M1、E5M2。以上 6 对 AFLP 引物对子群体 h 和子群体 q 共 58 个个体进行 PCR 扩增, 共产生 173 条扩增条带, 分子量范围

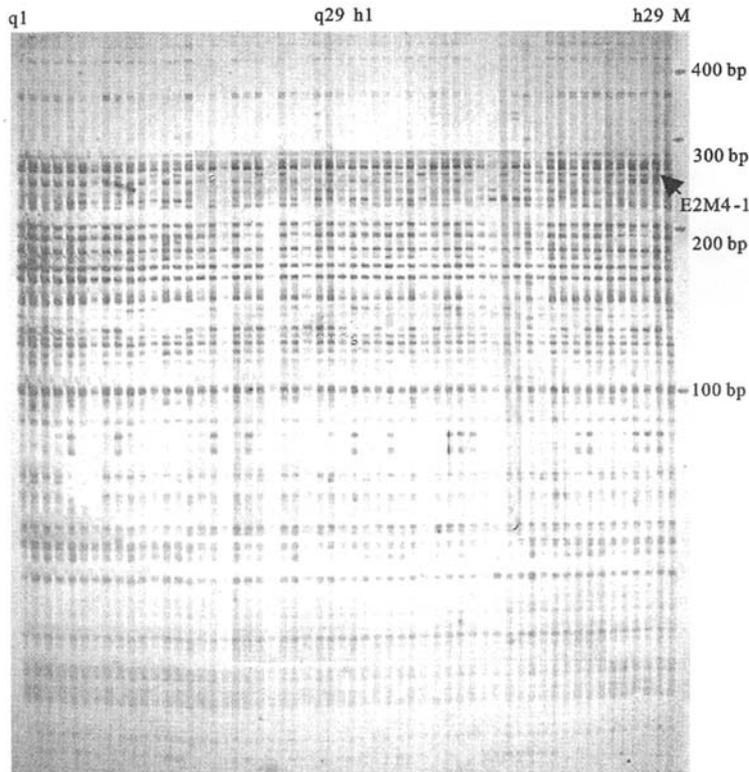


图1 引物组合 E2M4 对原种群体的扩增图谱

q1~29. 子群体 q; h1~29. 子群体 h; M. 100 bp 分子量标准

Fig. 1 AFLP-PCR pattern of primer pair E2M4 on original population

1~29. sub-stock q; h1~29. sub-stock h; M. 100 bp DNA ladder

在 50~400 bp 之间, 平均每对引物产生 29 条扩增条带, 其中多态性条带数为 72 条, 多态位点比例为 41.5%。子群体 q、h 的多态位点数分别为 61 和 70, 多态性片段的比例分别为 35.11%、40.43%。在 6 对引物产生的 173 条扩增条带中, 有 1 条编号为 E2M4-1 的条带在子群体 h 中的频率远远高于在子群体 q 中的出现频率, 该条带在 2 个子群体间的出现频率差别很大, 子群体 h 中的出现频率为 72.4%, 而子群体 q 中的出现频率仅为 20.6%。图 1 为引物 E2M4 扩增的 AFLP 图谱, 从图谱中可以看出鲮个体间的差异。标注位点为子群体 h 的高频位点。

3.2 鲮原种群体的遗传多样性分析

对所取鲮原种群体进行遗传多样性分析结果, 鲮原种群体的遗传多样性指数为 0.1254, 其子群体 h 与子群体 q 的遗传多样性指数分别为 0.1367 和 0.0998, 子群体 h 的遗传多样性指数远高于子群体 q。

4 讨论

本研究采用 AFLP 方法对广东鲮鱼原种场的鲮原种群体进行了遗传多样性分析。对鲮原种群体 2 个子群体遗传多样性分析表明, 子群体 h 的遗传多样性水平高于子群体 q ($0.1367 > 0.0998$), 2 个子群体间的遗传分化较为明显。这一结果与笔者此前采用 RAPD 方法研究的结果^[4]一致。广东鲮鱼原种场在对该批鲮原种的饲养观察中已发现, 子群体 h 的生长性能优于子群体 q, 因而获得子群体 h 相对于子群体 q 的特异性分子标记对于培育具有生长优势的鲮优良品系具有重要意义。AFLP 标记能够提供大量且高密度的信息位点, 因此, 有可能在表型不同的 2 个鲮原种子群体间筛选出具有群体特异性的分子标记。夏军红等^[5]采用 AFLP 方法从 36 对引物组合中筛选到一对长江豚性连锁分子标记的引物组合, 找到一个与性别相关的标记性位点。本研究从 25 对引物组合中选取了 6 对扩增中显示出有差异条带

的引物组合对该批鲮原种的2个子群体进行扩增,获得了1条在子群体h中的出现频率绝对高于子群体q的条带E2M4-1 (72.4% > 20.6%)。体色是由多基因控制的性状,条带E2M4-1有可能与控制体色的某基因位点呈不完全连锁。进一步扩大筛选范围,采用更多引物组合做进一步研究有望获得2个子群体间的特异性分子标记。

参考文献:

- [1] 胡红浪. 我国水产苗种发展战略研究, 连载(一)[J]. 中国水产, 2005(11): 6-8.
- [2] ZABEAU M, VOS P. Selective restriction fragment amplification; a general method for DNA fingerprinting [P]. European Patent Application 94202629. 7 (Publication No. 0534858A1). Paris: European Patent Office, 1993.
- [3] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nuclear Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [4] 朱彩艳, 叶卫, 夏军红, 等. 广东1个鲮原种群体的种质特征及遗传多样性分析[J]. 南方水产, 2005, 1(4): 1-5.
- [5] 夏军红. 天鵝洲白暨豚国家级自然保护区长江江豚遗传保护研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2004.
- [6] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, et al. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. [S.l.]: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, 1997.