

研究报告

Research Report

吉富罗非鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析

燕涛 郭昱嵩 王中铎 刘丽 刘楚吾*

广东海洋大学水产学院, 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室, 湛江, 524025

* 通讯作者, liucw@gdou.edu.cn

摘要 为了分析吉富罗非鱼的遗传多样性, 为其育种提供理论依据, 本实验利用 5 对引物组合(E-AGG/M-CTT, E-AGG/M-CTG, E-AAC/M-CAG, E-ACA/M-CTG, E-ACA/M-CAG)对广东省化州光辉养殖场有限公司新选育的吉富罗非鱼第 16 代群体(F_{16})进行遗传多样性的 AFLP 分析。27 个个体共检出 187 个扩增位点, 其中多态位点 163 个, 平均每对引物扩增出 32.6 个位点, 多态位点比例 87.17%; 平均 Nei's 基因多样性 0.288 6; 平均 Shannon's 指数 0.433 9。结果说明实验群体存在较丰富的遗传多样性且保持有较高的遗传杂合度, 具有进一步育种和开发的價值。

关键词 吉富罗非鱼, 扩增片段长度多态性(AFLP), 遗传多样性, 多态位点比例

Genetic Diversity of GIFT Tilapia Populations by AFLP Analysis

Yan Tao Guo Yusong Wang Zhongduo Liu Li Liu Chuwu*

Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025

* Corresponding author, liucw@gdou.edu.cn

DOI: 10.3969/gab.032.000207

Abstract The experiment was conducted to assess the genetic diversity of genetically improved farmed tilapia (GIFT) in order to evaluate and preserve this strain as a germplasm resource. The experiment study focused on the genetic diversity of the newly bred F_{16} population of GIFT tilapia obtained from Guanghui Farm Limited Company, Huazhou (Guangdong, China) was analyzed using AFLP. 187 bands were detected with 5 pairs of AFLP primers based on 27 individuals, and among them 163 (87.17%) were polymorphic with an average of 32.6 bands for per AFLP primer. Average Nei's gene diversity was 0.288 6, average Shannon's information index was 0.433 9. These results showed that the experiment group deposit had rich genetic diversity and maintained a high genetic heterozygosity, had further breeding and development value.

Keywords GIFT tilapia, AFLP, Genetic diversity, Proportion of polymorphic loci

吉富罗非鱼(genetically improved farmed tilapia, GIFT)是由国际水生生物资源管理中心(ICLARM)通过 4 个非洲原产地直接引进的尼罗罗非鱼品系(埃及, 加纳, 肯尼亚, 塞内加尔)和 4 个在亚洲养殖比较广泛的尼罗罗非鱼品系(以色列, 新加坡, 泰国, 中国台湾)经混合选育获得的优良品系(Eknath et al., 1993)。我国现有吉富罗非鱼主要是上海水产大学于 1994 年 6 月和 9 月分两批从菲律宾引进的第 3 代吉富罗非鱼的后代, 经过多代选育后, 2006 年经全国水产原种和良种审定委员会确认为罗非鱼新品种(李思发, 2001, 中国

水产, 10: 52-53; 李思发和蔡完其, 2008, 科学养鱼, 5 (20): 21-22)。吉富罗非鱼具有生长快、产量高、食性广、适应环境能力强以及肉质鲜美等优点, 现已在全国范围内广泛养殖, 成为我国重要的淡水养殖品种之一。因此, 对吉富罗非鱼群体进行检测和遗传分析, 揭示其群体的遗传多样性及种间遗传差异, 对吉富罗非鱼良种培育和分子标记辅助育种都具有重要意义。

荷兰科学家 Zabeau 和 Vos (1993)建立了一种新的检测 DNA 多态性的分子标记技术 - 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)

基金项目: 本研究由广东省海洋渔业科技攻关与研发项目(A201008C03; A201101B02)资助

技术。该技术具有所含信息量大、灵敏度高、符合孟德尔遗传等特点,且不需要预先明确研究对象的遗传背景,因此被广大研究人员所青睐,在生物学的各个领域已得到广泛的应用。目前,AFLP 标记已在遗传多样性分析、遗传图谱的构建、基因的定位及分析、种质资源鉴定等方面得到广泛的应用。杨淞等(2006)已利用 AFLP 技术对橙色莫桑比克罗非鱼和荷那龙罗非鱼的种群进行了遗传多样性分析,研究表明 2 个罗非鱼种群的遗传多样性均比较丰富,且橙色莫桑比克罗非鱼种群内遗传多样性相对更丰富些。李莉好等(2007)已利用 AFLP 技术对吉富罗非鱼不同选育群体的遗传多样性进行了分析,结果表明吉富罗非鱼具有进一步选育的潜力。Kocher 等(1998)和 Jeremy 等(2000)利用 AFLP 标记分别构建了不同来源的罗非鱼遗传图谱。本文利用 AFLP 技术对吉富罗非鱼群体(F_{16})进行遗传分析,为吉富罗非鱼的后续选育提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 DNA 提取、酶切、预扩增结果

部分吉富罗非鱼基因组 DNA,以及经 *EcoR* 和 *Mse* 双酶切,AFLP 预扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳结果见图 1~图 3。

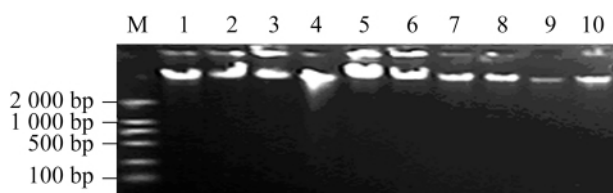


图 1 吉富罗非鱼基因组电泳图

注: M: DL2000 DNA Marker; 1~10: 部分吉富罗非鱼 DNA
Figure 1 Electrophoresis profiles of genome DNA of GIFT
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1~10: Profiles of genome DNA of GIFT

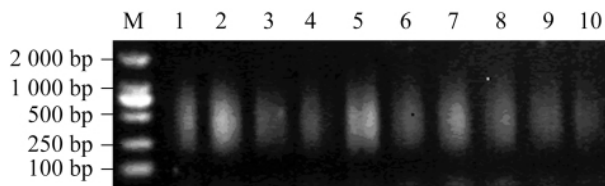


图 2 部分吉富罗非鱼个体基因组 DNA 双酶切电泳图

注: M: DL2000 DNA Marker; 1~10: 部分吉富罗非鱼 DNA 双酶切
Figure 2 Electrophoresis profiles of genome DNA of GIFT by double enzymes restriction cutting
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1~10: Profiles of genome DNA of GIFT by double enzymes restriction cutting

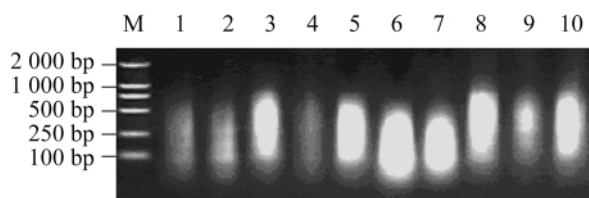


图 3 部分吉富罗非鱼个体酶切产物预扩增电泳图

注: M: DL2000 DNA Marker; 1~10: 部分吉富罗非鱼个体酶切产物
Figure 3 Electrophoresis profiles of pre-amplification of enzyme products of GIFT

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1~10: Profiles of pre-amplification of enzyme products of GIFT

1.2 AFLP 选择性扩增结果

利用筛选的 5 对引物组合对吉富罗非鱼 F_{16} 基因组 DNA 进行选择性的扩增后进行电泳,得到的部分电泳结果如图 4。

1.3 数据分析结果

利用引物组合 E-AGG/M-CTT、E-AGG/M-CTG、E-AAC/M-CAG、E-ACA/M-CTG、E-ACA/M-CAG 对吉富罗非鱼 F_{16} 中个体进行 AFLP 扩增,27 个个体共扩增出了 187 个位点,每对引物组合扩增的位点数在 32~55 之间,平均每对引物扩增出 37.4 个位点,其中多态性位点 163 个,多态位点比例为 87.17%。其中,E-AGG/M-CTT 检出条带数最多为 55 条,E-AAC/M-CAG 检出条带数最少为 32 条。多态位点比例最高的引物组合是 E-AGG/M-CTT,为 100.00%,最低的引物组合是 E-AGG/M-CTG,为 73.53%,如表 1 所示。AFLP 遗传标记符合孟德尔遗传定律(Lerceteau and Szmidt, 1999),因此可以将 1 个扩增片段作为 1 个基因,1 个个体的扩增片段组合即可视为此个体的基因型。表 1 所示 5 对引物组合所检出的基因型与实验标本数目相一致,即每个个体的扩增图谱都与其它个体的有差异,所用引物组合能有效检出这种差异。

用 Pop-Gen 对检测结果处理得到吉富罗非鱼 (F_{16}) 平均 Nei 基因多样性(H) 0.288 6,其中以 E-AA C/M-CAG 最高值为 0.306 2,E-AGG/M-CTG 最低值为 0.263 8;平均 Shannon 指数(I) 0.433 9,其中以 E-AGG/M-CTT 最高值为 0.458 0,E-AGG/M-CTG 最低值为 0.388 3,如表 2 所示。

2 讨论

扩增片段长度多态性(AFLP)技术的基础是 PCR 技术,基因组 DNA 首先用两种限制性内切酶进行切割,然后将双链接头连接在 DNA 片段末端,引物结

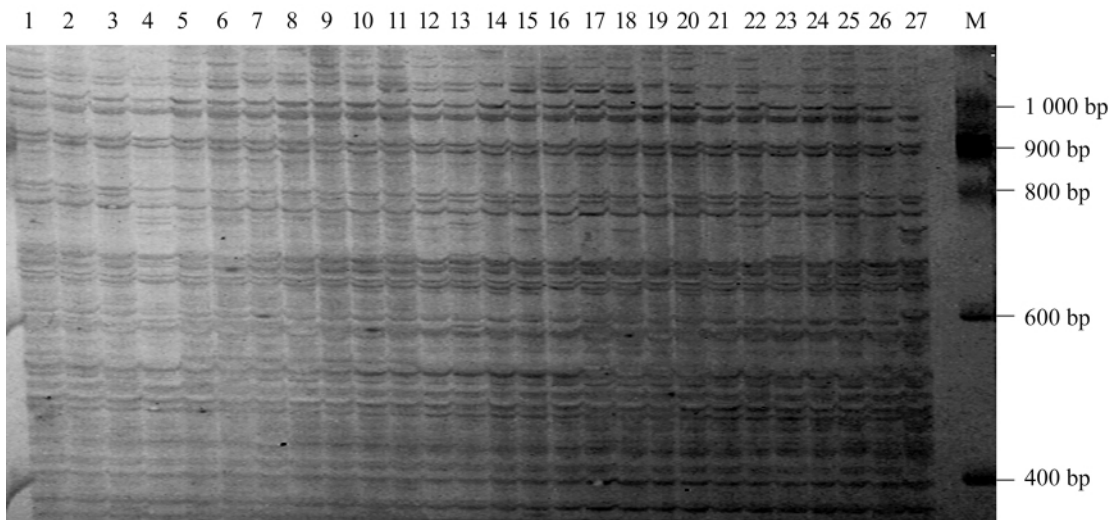


图4 引物 E-AGG/M-CTG 在吉富罗非鱼中的选择性扩图谱

注: M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1~27: 吉富罗非鱼中的选择性扩图谱

Figure 4 AFLP products detected by E-AGG/M-CTG of GIFT

Note: M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1~27: AFLP products detected of GIFT

表 1 5 对选择性引物从吉富罗非鱼基因组中扩增出的不同片段和基因型数

Table 1 Numbers of amplified bands and genotypes observed from AFLP analysis of GIFT by 5 couples of primer sets

引物 Primer	样本数 Samples	检出片段 Detected bands	多态片段, N (%) Polymorphic bands, N (%)	基因型数 Genotypes
E-AGG/M-CTT	27	55	55 (100.00)	27
E-AGG/M-CTG	27	34	25 (73.53)	27
E-AAC/M-CAG	27	32	28 (87.50)	27
E-ACA/M-CTG	27	33	26 (78.79)	27
E-ACA/M-CAG	27	33	29 (87.88)	27
总数 Total		187	163 (87.17)	140

表 2 吉富罗非鱼的遗传多样性指数

Table 2 The genetic diversity indexes of GIFT

引物 Primer	有效等位基因(Ne) Effective number of alleles (Ne)	平均 Nei's 基因多样性(H) Average Nei's gene diversity (H)	平均 Shannon's 指数(I) Average Shannon's information index (I)
E-AGG/M-CTT	1.504 9	0.299 9	0.458 0
E-AGG/M-CTG	1.469 4	0.263 8	0.388 3
E-AAC/M-CAG	1.541 2	0.306 2	0.454 3
E-ACA/M-CTG	1.484 0	0.278 8	0.413 2
E-ACA/M-CAG	1.496 8	0.294 1	0.441 8
总数 Total	1.499 5	0.288 6	0.433 9

合位点分别为接头序列和与接头序列相邻的内切酶位点序列,两种内切酶分别为六碱基的常见切割酶和四碱基的罕见切割酶(陈清华, 2005)。AFLP 具有 RFLP 的稳定性与 PCR 技术的高效性,可获得丰富而稳定的遗传标记,因此其被认为是理想的分子标记技术之一,现已广泛地应用于遗传图谱构建、遗传多样性分析、系统进化与分类学、遗传育种与种质鉴定等方面。

多态位点比例是衡量群体多样性的一个重要指标。本实验利用 5 对引物组合共得到 187 个位点,其中多态性位点 163 个,多态位点比例为 87.17%,说明选育群体存在较丰富的遗传多样性。王志勇等(2002)利用 5 对引物组合对福建官井洋大黄鱼野生种群和 2 个养殖群体进行研究得到的多态位点比例分别为 76.6%、70.6%、69.2%;匡友谊等(2007)利用 12 对引物组合对黑龙江水系呼玛河塔河河段呼玛河哲罗鱼

进行研究获得的多态位点比例为 84.43%。本实验所获得的遗传多态性略高于以上鱼类,主要原因可能与本研究所用的吉富罗非鱼群体在选育过程中严格控制近亲繁殖有关。但是,颜晓勇等(2011)利用 AFLP 标记对吉富罗非鱼遗传变异进行了研究,得到 F_0 代多态位点比例为 51.13%, F_6 代为 48.17%, F_7 代为 47.11%, F_8 代为 46.11%, F_9 代为 43.18%, 呈现出下降趋势,与本实验所得结果有差异,这可能与所选实验群体的选育方法及所选引物和图片处理方法不同有关。

Nei's 基因多样性(H)又称遗传杂合度,是各个位点的平均杂合度,能够反映各群体在几个位点上的遗传变异,一般认为它是一个较适合度量群体遗传变异的参数(宋红梅等,2008)。本实验,吉富罗非鱼(F_{16})群体的平均 Nei's 基因多样性为 0.2886。平均 Shannon's 指数(I)为 0.4339。这都明显高于李莉好等(2007)对吉富罗非鱼不同选育群体的遗传多样性所做研究获得的结果,表明所选实验群体保持有较高的遗传杂合度,具有进一步育种和开发的價值。

3 材料与方法

3.1 样品来源

试验所用吉富罗非鱼 27 尾,为 2011 年 1 月在广东省化州光辉养殖场有限公司采集的第 16 代群体(F_{16})。取其背部肌肉放于无水乙醇中, -20°C 保存备用。

3.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照《现代分子生物学实验技术》(卢圣栋,1999)的苯酚/氯仿法进行,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 4°C 保存备用。

3.3 AFLP 分析

3.3.1 基因组 DNA 酶切

用限制性内切酶 *EcoR* 和 *Mse* 双酶切。首先用 *Mse* 内切酶酶切,酶切反应体系如下: $10\times$ Tango Buffer 2.5 μL , *Mse* 0.5 μL (10 U/ μL), DNA 模板 3 μL , 双蒸水 14.0 μL 。 65°C 温浴 3 h 后,分别追加 *EcoR* 内切酶 0.5 μL (10 U/ μL) 和双蒸水 1.5 μL , 37°C 温浴酶切 3 h,然后 85°C 高温失活 15 min,等待连接。

3.3.2 连接反应

酶切完成后马上进行连接反应,每个反应体系为 $10\times$ Buffer 2 μL , T_4 连接酶 0.5 μL (5 U/ μL), 双酶切产物 10 μL , *Mse* 接头 0.5 μL (50 $\mu\text{mol/L}$), *EcoR* 接头 0.5 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), 加双蒸水至 20 μL , 20°C 连接过夜。

3.3.3 AFLP 预扩增反应

将连接产物稀释 10 倍后用于 AFLP 预扩增反应,预扩增引物如下: *EcoR* 预扩增引物(E-p) 5'-GACT GCGTACCAATTC-3', *Mse* 预扩增引物(M-p) 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。反应体系如下: $10\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL , E-p 1 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), M-p 1 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), dNTPs 2 μL (2.5 mmol/L), 连接产物(稀释 10 倍) 4 μL , *Taq* 酶 0.2 μL (5 U/ μL), 加双蒸水 14.3 μL 。反应程序:首先 94°C 预变性 2 min,然后 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 45 s, 72°C 延伸 60 s,进行 20 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶检测 AFLP 预扩增反应结果,扩增产物 4°C 保存。

3.3.4 AFLP 选择性扩增反应

AFLP 选择性扩增引物组合如下: E-AGG/M-CTT; E-AGG/M-CTG; E-AAC/M-CAG; E-ACA/M-CTG; E-ACA/M-CAG。反应体系如下: $10\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2.0 μL , *EcoR* 引物 1.0 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), *Mse* 引物 1.0 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), dNTPs 1.5 μL (2.5 mmol/L), 预扩增产物(稀释 20 倍) 3.0 μL , *Taq* 酶 0.2 μL (5 U/ μL), 加双蒸水补足至 25 μL 。

AFLP 选择性扩增反应程序采取“touch-down”策略,反应程序: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 30 s, 65°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s,进行 12 个循环,每个循环退火温度降低 0.7°C ,其它条件不变。然后再进行 24 个循环,反应条件为 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s,最后 72°C 延伸 10 min,扩增产物 4°C 保存。

3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 AFLP 选择性扩增产物

AFLP 选择性扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染(Wang et al., 2000),用数码相机拍照。

3.5 数据统计

利用 Gel-Pro analyzer 4.0 软件读取电泳图,并建立 1/0 矩阵,有带(显性表型)记为 1,无带(隐性表型)记为 0。PopGene32 分析观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、多态性位点比例、Nei's 基因多样性指数(H) (Nei, 1973)和 Shannon 氏指数(I) (Lewontin, 1972)。

作者贡献

燕涛负责实验的具体操作以及文章的撰写;王中铎对本实验操作,数据处理以及文章撰写提供了指导与帮助;刘楚吾是课题负责人,负责实验选题、设计,文章修改;郭昱嵩和刘丽对本实验操作以及文章撰写提供了指导与帮助。

致谢

感谢广东省海洋渔业科技攻关与研发项目(A201101B02; A201008C03)对本研究的资助 ;感谢广东省化州市光辉养殖场有限公司提供的实验材料 ;感谢罗杰老师在样品采集方面给予的支持与帮助。

参考文献

- Chen Q.H., 2005, Genetic diversity based on amplified fragment length polymorphism markers of the main pearly mussels in Dongting Lake, Thesis for M.S., Hunan Agricultural University, Supervisor: Xiao T.Y., pp.8-9 (陈清华, 2005, 洞庭湖区主要育珠蚌遗传多样性的 AFLP 分析, 硕士学位论文, 湖南农业大学, 导师: 肖调义, pp.8-9)
- Eknath A.E., Tayamen M.M., Palada-de Vera M.S., Danting J.C., Reyes R.A., Dionisio E.E., Capili J.B., Boliver H.L., Abella T.A., Circa A.V., Bentsen H.B., Gjerde B., Gjedrem T., and Pullin R.S.V., 1993, Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments, *Aquaculture*, 111(1/4): 171-188
- Jeremy J.A., Shingo S., and Avner C., 2000, Breeding new strains of tilapia: Development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci, *Aquaculture*, 185: 43-56
- Kocher T.D., Lee W.J., Sobolewska H., Penman D., and McAndrew B., 1998, A genetic linkage map of cichlidae fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Genetics*, 148: 1225-1232
- Kuang Y.Y., Tong G.X., Yin J.S., Liang L.Q., Sun X.W., and Ma L., 2007, AFLP analysis of genetic diversity of Hucho taimen in Huma River, *Zhongguo Shuichan Kexue (Journal of Fishery Sciences of China)*, 14(4): 615-621 (匡友谊, 佟广香, 尹家胜, 梁利群, 孙效文, 马波, 2007, 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析, *中国水产科学*, 14(4): 615-621)
- Lerceteau E., and Szmidt A.E., 1999, Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris*, *Heredity*, 82: 252-260
- Lewontin R.C., 1972, The apportionment of human diversity, *Evolutionary Biology*, 6: 381-398
- Li L.H., Yu D.H., Huang G.J., Du B., Fu Y., Tong Y., Guo Y.H., and Ye W., 2007, Genetic diversity of selected GIFT strains of *Oreochromis niloticus*, *Nanfang Shuichan (South China Fisheries Science)*, 3(5): 40-48 (李莉好, 喻达辉, 黄桂菊, 杜博, 符云, 童馨, 郭奕惠, 叶卫, 2007, 吉富罗非鱼不同选育群体的遗传多样性, *南方水产*, 3(5): 40-48)
- Lu S.D., ed., 1999, Experimental techniques of modern molecular biology, Second Edition, Peking Union Medical College Press, Beijing, China, pp.61-66 (卢圣栋, 主编, 1999, 现代分子生物学实验技术, 第二版, 中国协和医科大学出版社, 中国, 北京, pp.61-66)
- Nei M., 1973, Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12): 3321-3323
- Song H.M., Bai Y.C., Quan Y.C., and Li S.J., 2008, Identification and genetic structure analysis of three tilapias using microsatellite, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 16(6): 952-958 (宋红梅, 白俊杰, 全迎春, 李胜杰, 2008, 三种罗非鱼的微卫星分子鉴定和遗传结构分析, *农业生物技术学报*, 16(6): 952-958)
- Wang Z.Y., Wang Y.L., Lin L.M., Qiu S.Z., and Ben X.M., 2002, Genetic polymorphisms in wild and cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* using AFLP fingerprinting, *Zhongguo Shuichan Kexue (Journal of Fishery Sciences of China)*, 9(3): 198-202 (王志勇, 王艺磊, 林利民, 邱淑贞, 本信明, 2002, 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究, *中国水产科学*, 9(3): 198-202)
- Wang Z.Y., Khoo S.K., Ozaki A., and Okamoto N., 2000, Studies on the genetic variation in rainbow trout clones using AFLP fingerprinting and microsatellite DNA marker analysis, In: China Society of Fisheries, Asian Fisheries Society, World Aquaculture Society, Abstracts Book of the Third World Fisheries Congress, China Society of Fisheries, Beijing, China, pp.382
- Xie X.Y., Li S.F., Cai W.Q., Zhong J.X., Zhang H.H., Ye W., and Chen H.C., 2011, AFLP analysis of genetic diversity of GIFT strain *Oreochromis niloticus* during selection processing by AFLP, *Jinan Daxue Xuebao (Journal of Jinan University (Natural Science))*, 32(1): 88-93 (颀晓勇, 李思发, 蔡完其, 钟金香, 张汉华, 叶卫, 陈辉崇, 2011, 新吉富罗非鱼选育过程中遗传变异的 AFLP 分析, *暨南大学学报(自然科学版)*, 32(1): 88-93)
- Yang S., Ye X., Lu M.X., Huang Z.H., and Bai J.J., 2006, AFLP analysis of two species of *Tilapia O. mossambicus* and *O. hornorum*, *Zhongguo Haiyang Daxue Xuebao (Periodical of Ocean University of China)*, 36(6): 937-940 (杨淞, 叶星, 卢迈新, 黄樟翰, 白俊杰, 2006, 橙色莫桑比克罗非鱼和荷那龙罗非鱼的全 AFLP 分析, *中国海洋大学学报*, 36(6): 937-940)
- Zabean M., and Vos P., 1993, Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting, *European Patent EP0534858*