

不同鳊鲂鱼类群体微卫星 DNA 指纹图谱的 构建和遗传结构分析

张倩倩, 陈 杰, 蒋霞云, 邹曙明*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为对不同鳊鲂鱼类进行群体鉴定和遗传多样性分析, 从 60 对微卫星标记中筛选出 18 对多态性高的引物, 构建了 6 个鳊鲂鱼类群体的微卫星 DNA 指纹图谱。结果显示, 东江三角鲂、钱塘江三角鲂、厚颌鲂、广东鲂、团头鲂和长春鳊 6 群体的平均等位基因数(N_a)分别为 5.17、6.11、3.50、6.56、5.22、5.22, 平均期望杂合度(H_e)分别为 0.634 2、0.720 4、0.546 2、0.681 2、0.675 2、0.559 7, 平均多态信息含量(PIC)分别为 0.575 6、0.666 9、0.472 0、0.630 6、0.606 4、0.517 0, 表明钱塘江三角鲂的遗传多样性最高, 厚颌鲂的遗传多样性最低; 聚类分析表明, 钱塘江三角鲂和团头鲂首先聚为一支, 遗传距离较近, 为 0.560 6; 厚颌鲂与长春鳊的遗传距离最远, 为 1.759 2。引物 Mam03 和 EST37 产生的特异条带可将鲂属和鳊属鱼类区分, 鉴定出鳊属鱼类长春鳊; 引物 TTF3、EST37、TTF2/TTF10、EST66 依次组合可区分出鲂属东江三角鲂、厚颌鲂和广东鲂这 3 个群体。研究结果为我国鳊鲂鱼类种质资源保存、种群鉴定和良种选育奠定了基础。

关键词: 鳊属; 鲂属; 微卫星标记; DNA 指纹图谱; 遗传结构

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

鳊鲂鱼类, 即鳊属 (*Parabramis*) 和鲂属 (*Megalobrama*), 两者都隶属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲂亚科 (Culterinae)。一些鳊鲂鱼类由于形态差异不显著, 在命名上存在分歧^[1-2]。在分类上, 鲂属通常分为 4 个种, 即三角鲂 (*M. terminalis*)、广东鲂 (*M. hoffmanni*)、厚颌鲂 (*M. pellegrini*) 和团头鲂 (*M. amblycephala*)。鳊属鱼类仅有长春鳊 (*P. pekinensis*), 又名鳊鱼。鳊鲂鱼类广泛分布于我国江河、湖泊中, 在我国淡水养殖业及淡水捕捞业中占有重要的经济地位。近几十年来, 由于兴建水利工程、围湖造田、过度捕捞、不恰当的人工驯养以及缺乏科学管理等原因, 使我国鳊鲂鱼类天然资源处于严重的衰退之中, 其基因库也受到了严重威胁^[3]。另外, 由于地理分布上的叠加, 鳊鲂鱼类形态和生活习性较为相近, 在自然条件下有可能相互交配, 从而造成种质混杂, 原种鉴别日益迫切^[4]。当前, 关于鳊鲂鱼类的研究中, 在遗

传水平上利用分子标记技术对鳊属和鲂属鱼类的属间区分还未见报道。宏观方面, 虽先后有学者^[5-6]从形态度量方面对其进行过种群区分, 但宏观的种群鉴定方法易受外界环境影响, 存在一定的局限性。

微卫星, 即简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 是普遍存在于真核生物基因组中的由几个核苷酸 (1~6 bp) 组成的串联重复结构^[7], 作为一种分子标记, 具有共显性标记、在整个基因组随机分布和多态性丰富等特点, 相比其它标记更能揭示整个基因组的总体特征^[8], 已广泛应用于 DNA 指纹图谱的构建。本研究拟通过筛选出的微卫星位点, 以鳊属 (长春鳊) 和鲂属 (东江和钱塘江三角鲂 2 群体、广东鲂、厚颌鲂和团头鲂) 5 种群 6 群体为实验材料, 对其进行遗传结构分析, 并构建我国主要鳊鲂鱼类的 DNA 指纹图谱数据库, 从而为鳊鲂鱼类种质资源保存、种群鉴定和良种选育奠定基础。

收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-11-23

资助项目: “十二五”国家科技支撑计划 (2012BAD26B00); 国家自然科学基金项目 (31272633, 31201760)

通信作者: 邹曙明, E-mail: smzou@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

5个鲂属鱼类群体(东江三角鲂、钱塘江三角鲂、广东鲂、团头鲂、厚颌鲂)和1个鳊属鱼类群体(长春鳊),均保存于上海海洋大学农业部团头鲂育种中心。其中,东江三角鲂(SJF1)取自广东珠江东江支流河源段、钱塘江三角鲂(SJF2)取自杭州市农业科学院水产研究所、广东鲂(GDF)取自广东南海沙头镇大健鱼苗场、团头鲂(TTF)取自上海松江国家级团头鲂良种场,厚颌鲂(HHF)取自重庆市东平水产养殖有限公司,长春鳊(CCB)

取自长江江苏靖江段。除了东江三角鲂、长春鳊是原种和团头鲂是选育良种外,其它3个群体皆是原种后代。每群体取样30尾,共180尾,剪取鱼鳍,放入95%的酒精中,保存于-20℃备用。

1.2 微卫星引物

共60对SSR引物用于本研究。其中10对引物来自Tang等^[9]利用5'锚定PCR技术开发的团头鲂微卫星引物,10对引物来自Li等^[10]利用磁珠富集得到的SSR引物,另外40对引物来自Gao等^[11]经转录组测序分析得到的EST-SSR引物。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。SSR位点及引物信息(表1)。

表1 微卫星引物特征
Tab.1 Characteristics of microsatellite primers

序号 no.	位点 locus	重复序列 repeat motif	等位基因数 number of alleles	退火温度/℃ annealing temperature	引物序列(5'→3') primer sequence
1	TTF1	(CA) ₂₁	17	55.9	F:GGAGATGAAAGCTGAAGGAA R:ATGCACGAACTGCCACATAA
2	TTF2	(CA) ₅ (CT) ₂₁	13	55.9	F:AAACAGCTGCTACCCTTGGA R:TTTGCCAGAAGAGCAAATCA
3	TTF3	(TC) ₂₇	11	56.4	F:AAGACGCCACGGAACTTTA R:CTGACCGGATAGCAAAGTGA
4	TTF4	(CA) ₁₄	7	60.5	F:GACTGGAGTCGTCAGGCTTC R:TGCCCCACATTGTTAGACTG
5	TTF5	(CA) ₁₅	8	60.5	F:CTAGTGGGTAGGTGGCAGGT R:GACTGGGAGAGACAGAGGAG
6	TTF6	(GA) ₁₃	6	60.5	F:GGCAGGTCAGGCACATTTAT R:TCTCTACCTCACATCTCTCATTCT
7	TTF7	(GT) ₁₃	3	60.5	F:ATGGGTAAGCCGATGGATTC R:GTGTCAGCATTCCAGCTCCT
8	TTF8	(GT) ₁₈	5	60.5	F:GGGAAAATAAAGGGAGAAAGTG R:TTTCTCTGATCCGTTGACC
9	TTF9	(TC) ₁₉	7	56.9	F:AAGACGCCACGGAACTTTA R:GAGGTGGGACTGTGTGGAAT
10	TTF10	(TC) ₆ (TG) ₅	3	55.9	F:AAACAGGCTCGCCAATTTT R:TCACCCACACACTCTTATTCTCTC
11	Mam02	(TG) ₁₃	4	65.0	F:TTCGGTTCTGCCTTCACTCT R:AAGACGCATGCTCAACAACA
12	Mam03	(CA) ₁₈	4	60.0	F:TTGCAGGTAAGTGGGAAAA R:AGCAACATGCAAACATCAAAA
13	Mam25	(AC) ₅ (AC) ₁₄	2	62.0	F:TCACACCAACAACACCGAAT R:CCTTGTCTTCTCCAGGCATC
14	EST13	(AC) ₁₄	5	55.5	F:TCTTTCACAAAACAACCCTT R:GGATTATCAAACGCGGACT
15	EST23	(AC) ₁₂	5	57.5	F:GCGATCATCAAGGCAACG R:AGATTATCAGCTCCTGTAGTGT
16	ES37	(TG) ₈	6	54.0	F:CACAAACCATAAACACAG R:AATGCCCATAAAACACAC
17	EST43	(CA) ₁₄	2	58.0	F:CGTAACCCAACTGTATCCG R:GTTCACTCGTGCCCATCC
18	EST66	(CA) ₁₂	5	50.0	F:TCAATCAGGCATAAACAT R:AACTAACTAGCACGCAAA

注:F为正向引物;R为反向引物;TTF1~TTF10、Mam02~Mam25和EST13~EST66是团头鲂微卫星引物,分别来源于文献[9-11]

Notes:F. forward primer; R. reverse primer; TTF1 - TTF10, Mam02 - Mam25, and EST13 - EST66 are microsatellite primers and are respectively from Reference[9],[10]and[11]

1.3 基因组 DNA 的制备

参照北京天根生物科技有限公司生产的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)说明书介绍的方法提取样品基因组 DNA。基因组 DNA 提取完成后,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 质量和浓度, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 PCR 反应体系与扩增程序

反应体系 10 μL , 包含 5 μL 含染料的 $2 \times \text{Taq}$ PCR MasterMix (Taq DNA Polymerase: 0.1 U/ μL ; MgCl_2 : 4 mmol/L; dNTPs each: 0.4 mmol/L), 上下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL 模板 DNA (30 ~ 50 ng), 3.5 μL ddH₂O。PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler ep gradients 型 PCR 仪上进行, 反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (根据表 1 中各引物的退火温度进行调整) 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.5 PCR 产物凝胶电泳检测

PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 胶片大小为 195 mm(长) \times 120 mm(宽) \times 1 mm(厚)。产物上样量均为 1 μL , DNA Marker (pBR322 DNA/*Msp*I) 上样量为 0.5 μL 。电泳条件: 电泳缓冲液为 $1 \times \text{TBE}$, 电压 200 V, 电泳 1.5 ~ 2 h (具体时间根据 PCR 产物分子量大小而定)。电泳完成后, 进行硝酸银染色, 染色方法根据高东等^[12]的方法进行了部分修改。最后将胶片平铺于观片灯箱上, 用数码相机照相并存入电脑。

1.6 数据统计与分析

用 Quantity One 凝胶图像分析软件分析微卫星条带大小, 根据每个个体产生的条带位置确定基因型。用 Popgene (Version 1.32) 软件进行分析, 计算每个微卫星座位分别在 6 个群体中的等位基因数 (number of alleles, N_a) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e), 并计算群体间的 Nei 氏遗传相似性 (genetic identity) 和遗传距离 (genetic distance), 并基于该遗传距离利用 MEGA 5.1 软件^[13]对 6 个鳊鲂鱼类群体供试材料进行基于非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 的树状聚类图的绘制。最后用 Cervus 3.0 软件计算多态信息含量 (PIC)。

2 结果

2.1 6 个鳊鲂鱼类群体的 SSR 扩增结果

本实验共计筛选了团头鲂微卫星引物 60 对,

其中 53 对引物在实验的 6 个群体中有特异扩增条带, 扩增成功率达 88.3%, 其中 18 对微卫星引物具有种间相容性高、多态性良好特征。利用这 18 对微卫星引物对鳊鲂鱼类 6 群体共 180 尾样品进行扩增分析, 每个位点检测到的等位基因数 2 ~ 20 个不等, 共检测出 221 个等位基因。在 6 个鳊鲂群体中, 东江三角鲂、长春鳊、厚颌鲂、广东鲂、钱塘江三角鲂和团头鲂群体的平均等位基因数 (N_a) 依次为 5.17、5.22、3.50、6.56、6.11 和 5.22, 平均期望杂合度 (H_e) 分别为 0.634 2、0.559 7、0.546 2、0.681 2、0.720 4 和 0.675 2, 平均多态信息含量 (PIC) 分别为 0.575 6、0.517 0、0.472 0、0.630 6、0.666 9 和 0.606 4 (表 2)。从这些遗传参数中可得出, 这 6 个群体的遗传多样性从高到低依次为钱塘江三角鲂 > 广东鲂 > 团头鲂 > 东江三角鲂 > 长春鳊 > 厚颌鲂, 即钱塘江三角鲂的遗传多样性最高, 厚颌鲂的遗传多样性最低。

2.2 6 个鳊鲂鱼类群体的 SSR-DNA 指纹模式图

利用 EXCEL 作图软件, 根据鳊鲂鱼类 6 个群体在 18 个微卫星位点上的扩增结果, 按照表 1 中微卫星编号顺序构建东江三角鲂、钱塘江三角鲂、长春鳊、广东鲂、厚颌鲂和团头鲂这 6 个群体的 DNA 指纹模式图 (图 1)。

2.3 不同鳊鲂鱼类群体的微卫星鉴别标记分析

从微卫星指纹图谱 (图 1) 中, 我们筛选到 9 个特异的微卫星标记 (TTF1、TTF2、TTF3、TTF7、TTF10、Mam03、Mam25、EST37 和 EST66) 可用于鳊鲂鱼类群体的区分, 每个标记至少在其中一个群体中可以扩增出独有的条带, 从而将这个群体与其它群体区分开来。其中, 产生的特异性条带 Mam03-201bp 和 EST37-123bp 可将鲂属和鳊属鱼类区分, 直接鉴定出鳊属鱼类长春鳊 (图 2)。另外, 标记 TTF3、EST37、TTF2/TTF10、EST66 依次组合可完全区分鲂属东江三角鲂、厚颌鲂和广东鲂这 3 个群体。但是, 没能在钱塘江三角鲂和团头鲂中找到特异标记来区分这两个群体, 说明这两个群体的遗传结构比较一致。以“1”和“0”分别表示扩增产物的“有”和“无”^[14], 将这 9 个特异微卫星标记产生的多态位点按照扩增产物大小由小到大依次排序, 建立计算机化的数字 DNA 指纹 (表 3), 可作为中国鳊鲂鱼类种质鉴定的参照。

表 2 鳊鱼类微卫星位点的等位基因数、期望杂合度和多态信息含量

Tab.2 Number of alleles (N_a), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) of microsatellite loci

位点 locus	片段 大小/bp product size	等位基因数 N_a						期望杂合度 H_e						多态信息含量 PIC					
		SJF1	CCB	HHF	GDF	SJF2	TTF	SJF1	CCB	HHF	GDF	SJF2	TTF	SJF1	CCB	HHF	GDF	SJF2	TTF
TTF1	243~335	8	5	4	7	10	9	0.772 3	0.770 1	0.672 9	0.791 0	0.848 0	0.815 8	0.724 7	0.716 6	0.612 9	0.743 2	0.813 7	0.779 6
TTF2	202~274	5	9	3	5	5	4	0.684 2	0.783 1	0.49 10	0.742 9	0.666 7	0.721 5	0.625 6	0.738 8	0.434 6	0.685 3	0.619 1	0.658 4
TTF3	224~279	2	2	3	7	5	4	0.155 4	0.325 4	0.671 2	0.818 6	0.676 8	0.665 0	0.141 1	0.268 8	0.585 6	0.777 3	0.611 2	0.595 9
TTF4	157~282	11	9	7	11	12	8	0.845 2	0.881 4	0.750 3	0.759 3	0.856 5	0.780 2	0.811 1	0.852 0	0.703 2	0.713 3	0.824 5	0.733 9
TTF5	150~222	8	7	3	8	8	7	0.836 2	0.815 8	0.569 5	0.542 4	0.859 3	0.558 2	0.798 0	0.773 9	0.461 3	0.513 2	0.825 3	0.524 3
TTF6	182~218	5	8	3	5	5	4	0.736 2	0.839 5	0.569 5	0.548 6	0.721 5	0.665 0	0.678 4	0.805 2	0.461 3	0.506 5	0.659 0	0.607 5
TTF7	279~335	4	4	3	3	4	3	0.524 3	0.393 8	0.569 5	0.594 9	0.653 1	0.657 1	0.479 0	0.357 5	0.461 3	0.512 9	0.574 7	0.573 4
TTF8	162~224	3	1	2	4	5	5	0.554 2	0.000 0	0.506 2	0.650 3	0.792 1	0.685 3	0.441 5	0.000 0	0.373 9	0.578 0	0.744 1	0.615 8
TTF9	269~319	2	2	4	6	5	6	0.155 4	0.507 9	0.642 4	0.813 6	0.505 6	0.744 1	0.141 1	0.374 7	0.580 5	0.770 2	0.463 3	0.686 4
TTF10	255~308	2	4	3	6	3	3	0.508 5	0.267 8	0.458 8	0.745 2	0.599 4	0.626 6	0.375 0	0.242 8	0.392 9	0.690 3	0.505 2	0.534 6
Mam02	226~281	5	5	6	10	6	4	0.732 8	0.628 8	0.787 0	0.855 4	0.782 5	0.680 8	0.678 1	0.550 2	0.738 1	0.822 7	0.733 5	0.610 4
Mam03	231~324	6	1	5	16	8	5	0.822 6	0.000 0	0.694 4	0.937 3	0.847 5	0.731 1	0.780 8	0.000 0	0.629 9	0.916 3	0.812 5	0.668 6
Mam25	166~252	4	9	2	9	6	2	0.734 5	0.861 6	0.508 5	0.836 7	0.738 4	0.508 5	0.671 5	0.829 6	0.375 0	0.802 9	0.681 6	0.375 0
EST13	209~266	11	10	4	3	9	9	0.853 1	0.862 1	0.705 1	0.538 4	0.846 3	0.755 4	0.819 3	0.829 2	0.637 8	0.432 7	0.812 5	0.724 3
EST23	265~352	6	8	7	5	4	5	0.802 8	0.870 6	0.727 7	0.745 2	0.687 6	0.654 8	0.757 0	0.839 2	0.673 0	0.694 2	0.623 8	0.579 6
EST37	147~216	4	1	1	2	4	6	0.544 1	0.000 0	0.000 0	0.472 3	0.591 5	0.623 7	0.482 7	0.000 0	0.000 0	0.356 6	0.537 8	0.547 4
EST43	401~493	2	2	2	1	2	2	0.488 1	0.440 1	0.508 5	0.000 0	0.440 1	0.508 5	0.364 8	0.339 1	0.375 0	0.000 0	0.339 1	0.375 0
EST66	290~349	5	7	1	10	9	8	0.665 5	0.826 0	0.000 0	0.866 7	0.854 8	0.771 8	0.591 1	0.788 7	0.000 0	0.835 3	0.822 9	0.725 5
平均 mean		5.17	5.22	3.5	6.56	6.11	5.22	0.634 2	0.559 7	0.546 2	0.681 2	0.720 4	0.675 2	0.575 6	0.517 0	0.472 0	0.630 6	0.666 9	0.606 4

注: SJF1: 东江三角鲂, SJF2: 钱塘江三角鲂, CCB: 长春鳊, HHF: 厚颌鲂, GDF: 广东鲂, TTF: 团头鲂。下同

Notes: SJF1: *M. terminalis* from Dong River, SJF2: *M. terminalis* from Qiantang River, CCB: *P. pekinensis*, HHF: *M. pellegrini*, GDF: *M. hoffmanni*, TTF: *M. amblycephala*. The same as below

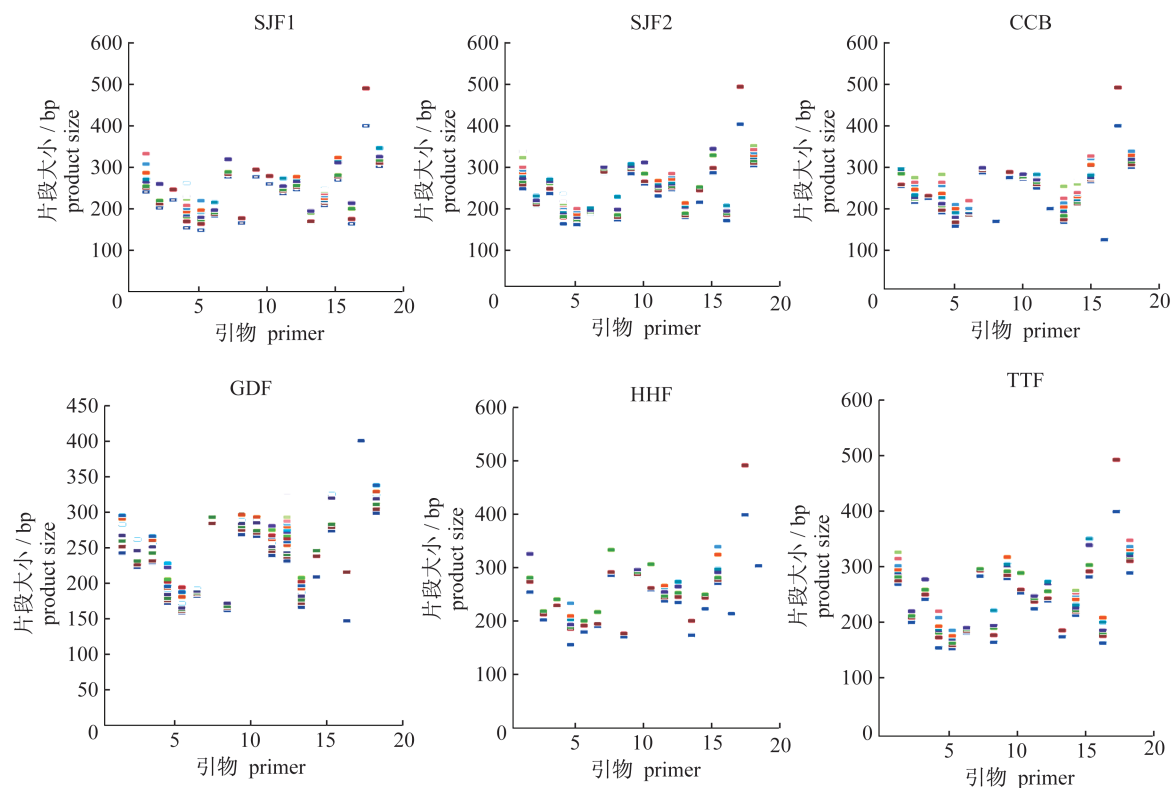


图 1 鳊鱼类微卫星 DNA 指纹模式图

Fig. 1 Microsatellite DNA fingerprintings of genera *Megalobrama* and *Parabramis*

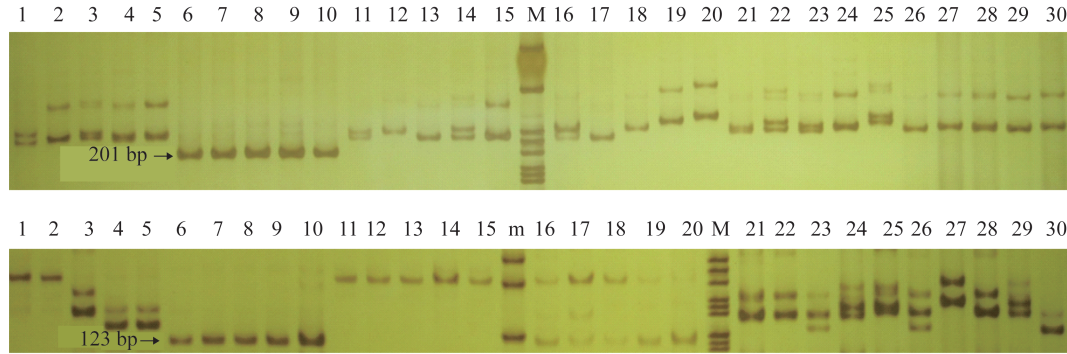


图 2 Mam03(上图)和 EST37(下图)引物在不同鳊鲂鱼类群体中的 PAGE 图谱

M;PBR322 DNA/Msp I 标准分子量,m:50 bp DNA Ladder; 1~5:东江三角鲂; 6~10:长春鳊; 11~15:厚颌鲂; 16~20:广东鲂; 21~25:钱塘江三角鲂; 26~30:团头鲂。箭头显示为长春鳊的特性标记

Fig. 2 PAGE analysis by primers Mam03 (upper) and EST37 (lower) among genus *Megalobrama* and *Parabramis* M;PBR322 DNA/Msp I marker, m:50 bp DNA Ladder; 1-5; *M. terminalis* from Dong River; 6-10; *P. pekinensis*; 11-15; *M. pellegrini*; 16-20; *M. hoffmanni*; 21-25; *M. terminalis* from Qiantang River; 26-30; *M. amblycephala*. Specific molecular markers of *P. pekinensis* are shown with arrows

表 3 不同鳊鲂鱼类群体的数字化 DNA 指纹

Tab. 3 The numbered microsatellite DNA fingerprinting of genera *Megalobrama* and *Parabramis*

标记 marker	数字化指纹 numbered fingerprint	鉴别群体 identification of different populations
TTF1	SJF1:1110101001000010001 CCB:0110000010011000000 HHF:0010000110000000010 GDF:1101100010101000000 SJF2:1101100111001000101 TTF:0000010110111101010	SJF1-TTF
TTF2	SJF1:1101010000010 CCB:0001111111111 HHF:010110000000 GDF:000001111010 SJF2:111100100000 TTF:101101000000	HHF-GDF
TTF3	SJF1:1000100000 CCB:1100000000 HHF:0111000000 GDF:0111011110 SJF2:0011001110 TTF:0001010101	SJF1-HHF/GDF/SJF2/TTF CCB-SJF2/TTF
TTF7	SJF1:1010100010 CCB:0010101100 HHF:0001010001 GDF:0110010000 SJF2:0110101000 TTF:0010001100	HHF-SJF1/CCB/SJF2/TTF
TTF10	SJF1:010000010000 CCB:000011110000 HHF:011000000001 GDF:000111001110 SJF2:110000010001 TTF:110000000100	CCB-HHF/TTF GDF-SJF1/HHF/SJF2
Mam03	SJF1:000000111010110000 CCB:100000000000000000 HHF:001001010010100000 GDF:01111101111111111 SJF2:000110111010110000 TTF:000110001001100000	CCB-SJF1/HHF/GDF/SJF2/TTF
Mam25	SJF1:0110001100000 CCB:1010101110111 HHF:0001000010000 GDF:1011111111000 SJF2:0011100111000 TTF:0001010000000	TTF-SJF1/CCB SJF1-HHF
EST37	SJF1:001100101 CCB:100000000 HHF:000000001 GDF:010000001 SJF2:001111100 TTF:001111110	CCB-SJF1/HHF/GDF/SJF2/TTF HHF-SJF2/TTF, GDF-SJF2/TTF
EST66	SJF:001110010001 CCB:011110110010 HHF:001000000000 GDF:011110101010 SJF2:011111100111 TTF:100111100111	HHF-TTF

2.4 不同鳊鲂鱼类群体间的遗传距离和聚类分析

用 Popgene (Version 1.32) 软件计算鳊鲂鱼类 6 个群体间的 Nei 氏遗传相似性和遗传距离,发现 6 个群体间的 Nei 氏遗传相似系数为 0.172 2 ~ 0.570 9,遗传距离为 0.560 6 ~ 1.759 2(表 4)。其

中钱塘江三角鲂和团头鲂的相似系数最高,为 0.570 9,厚颌鲂和长春鳊的遗传相似性最低,为 0.172 2。基于不同群体间 Nei 氏遗传距离,利用 MEGA 5.1 软件构建了 6 个群体鳊鲂鱼类间的 UPGMA 聚类关系(图 3)。其中,鲂属钱塘江三角鲂和团头鲂首先聚为一支;而后,这支再依次与鲂

属的东江三角鲂、广东鲂、厚颌鲂聚类,最后与鳊属的长春鳊聚类。其中厚颌鲂与长春鳊的遗传距离

最远,为 1.759 2。

表 4 鳊鲂鱼类不同群体的 Nei 氏遗传相似性(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)
Tab. 4 Nei's genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal) in genera *Megalobrama* and *Parabramis*

群体 populations	SJF1	HHF	GDF	SJF2	TTF	CCB
SJF1		0.384 2	0.375 7	0.522 2	0.311 4	0.379 2
HHF	0.956 5		0.303 8	0.318 2	0.347 0	0.172 2
GDF	0.979 1	1.191 4		0.426 6	0.279 5	0.301 8
SJF2	0.649 6	1.145 1	0.851 9		0.570 9	0.320 8
TTF	1.166 7	1.058 4	1.274 8	0.560 6		0.205 7
CCB	0.969 6	1.759 2	1.198 0	1.136 9	1.581 5	

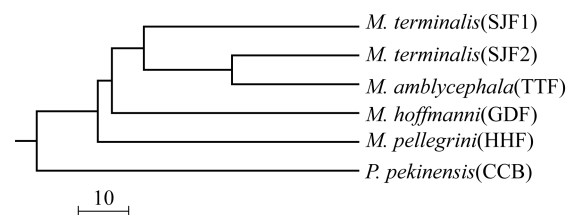


图 3 鳊鲂鱼类群体的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Dendrogram of relationships among genera *Megalobrama* and *Parabramis* using UPGMA method of clustering

3 讨论

3.1 鳊鲂鱼类微卫星标记的种间扩增适用性

微卫星基因座位在相近物种侧翼序列具有一定的同源性,可作为种间比较研究的标记。如 Shi 等^[15]证实泉水鱼(*Pseudogyrincheilus procheilus*)中开发的多态微卫星引物适用于其近缘物种墨头鱼(*Garra lamta*)和白甲鱼(*Onychostoma sima*),表现出较高的种间适用性。Chen 等^[16]在小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)中开发的 35 对微卫星引物适用于近缘种大黄鱼(*Larimichthys crocea*),具有很好的通用性。尹绍武等^[17]利用小鳞喙鲈(*Mycteroperca microlepis*)、黑缘石斑鱼(*Epinephelus morio*)和夏威夷石斑鱼(*Epinephelus quernus*)的微卫星标记在南海 4 种石斑鱼中扩增良好。孙效文等^[18]和全迎春等^[19]曾利用部分斑马鱼(*Danio rerio*)的 SSR 标记开展了鲤(*Cyprinus carpio*)遗传图谱的构建和种间遗传差异分析,这些微卫星标记在亚科间具有适用性。在鳊鲂鱼的研究中,微卫星引物在种间也表现出较好的适用性^[10,20-22]。本实验共计筛选了团头鲂微卫星引物 60 对,其中 53 对引物在实

验的 6 个群体中可扩增出稳定的特异性条带,扩增成功率达 88.3%,其中 18 对在鳊鲂种间具良好遗传多样性、可信度和可操作性。

3.2 6 个鳊鲂鱼类群体的遗传结构分析

从遗传角度来讲,等位基因的数目(N_a)、遗传杂合度(H_e)和多态性信息含量(PIC)等遗传参数可从多个角度反映群体的遗传多样性和遗传潜力^[23]。并且,通常认为 $PIC > 0.5$ 为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态^[24]。本研究中东江三角鲂、钱塘江三角鲂、广东鲂、团头鲂和长春鳊这 5 个鳊鲂鱼类群体平均等位基因(N_a)、平均期望杂合度(H_e)和平均多态信息含量(PIC)分别为 5.17~6.56、0.559 7~0.720 4 和 0.517 0~0.666 9,表明这 5 个群体具有较高的遗传多样性。另外,相比其它鳊鲂鱼类,厚颌鲂的遗传多样性最低(平均 N_a 、 H_e 和 PIC 依次为 3.5、0.546 2 和 0.472 0),表现为中度遗传多样性,这与易少奎等^[21]的研究结果(平均 $N_a = 3.08$, $H_e = 0.51$)基本吻合。

利用 UPGMA 法对这 6 个鳊鲂鱼类群体进行聚类分析,结果表明鲂属之间的群体先聚类,最后才与鳊属聚类,这一聚类结果说明鲂属和鳊属的分类比较明确,属间遗传差异较大。然而,在鲂属群体聚类中,钱塘江三角鲂和团头鲂首先聚为一支,而后,这支再依次与东江三角鲂、广东鲂、厚颌鲂聚类。钱塘江三角鲂竟先与团头鲂聚类,而没有先与属于同种的东江三角鲂聚类,说明钱塘江三角鲂和团头鲂的遗传结构比较一致。这与李思发等^[4]通过形态判别、同工酶分析和 RAPD 分析显示钱塘江三角鲂和团头鲂差异较小的结果一致,也与谢楠等^[25]通过线粒体 *Cyt b* 片段分析,显示钱塘江三角鲂群体聚类不明确相一致,这些结果说明广东东江

三角鲂在遗传上与钱塘江三角鲂差异较大。

3.3 6 个鳊鲂鱼类群体 DNA 指纹图谱及分子标记

本研究利用 18 个微卫星座位,构建了 6 个鳊鲂鱼类群体的 DNA 指纹数据库,并根据其等位基因片段大小制成了微卫星 DNA 指纹模式图谱,再从中找出用于种群区分的 9 对特异性引物,进行鳊鲂鱼类的群体鉴定,并且为杂交种和亲权鉴定提供参考。其中,引物 Mam03 和 EST37 产生的特异条带可将鲂属和鳊属鱼类区分,鉴定出鳊属鱼类长春鳊;引物 TTF3、EST37、TTF2/TTF10、EST66 依次组合可区分出鲂属东江三角鲂、厚颌鲂和广东鲂这 3 个群体。然而,本研究没能找到区分钱塘江三角鲂和团头鲂的有效微卫星标记,这可能与所用微卫星标记不够多有关,同时也与二者间的遗传结构比较一致有关。

参考文献:

- [1] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic synopsis of Chinese fishes [M]. Beijing: Science Press, 1987: 427 - 431. [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987: 427 - 431.]
- [2] Luo Y L. A revision of fishes of the cyprinid genus *Megalobrama* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1990, 14(2): 160 - 164. [罗云林. 鲂属鱼类的分类整理. 水生生物学报, 1990, 14(2): 160 - 164.]
- [3] Li J L, Tang Y K, Yu J H. Genetic diversity in *Parabramis pekinensis* from the lower reaches of the Yangtze River from RAPD analysis and mitochondrial D-loop sequences [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(2): 145 - 151. [李建林, 唐永凯, 俞菊华. 用 RAPD 及 mtDNA D-loop 区序列揭示长江下游长春鳊遗传多样性. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 145 - 151.]
- [4] Li S F, Zhu Z W, Zou S M, et al. Bluntnose black bream (*M. amblycephala*), guangdong black bream (*M. hoffmanni*) and black bream (*M. terminalis*) [J]. Acta Zoologica Sinica, 2002, 48(3): 339 - 345. [李思发, 朱泽闻, 邹曙明, 等. 鲂属团头鲂、三角鲂及广东鲂种间遗传关系及种内遗传差异. 动物学报, 2002, 48(3): 339 - 345.]
- [5] Cai J M, Zhang M Y, Zeng Q L, et al. A study on morphometrics of the genus *Megalobrama* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(6): 631 - 635. [蔡鸣俊, 张敏莹, 曾青兰, 等. 鲂属鱼类形态度量学研究. 水生生物学报, 2001, 25(6): 631 - 635.]
- [6] Song W, Wang Y Z, Zhu D M, et al. Morphological variations among the genus *Megalobrama* [J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(3): 21 - 27. [宋文, 王艺舟, 祝东梅, 等. 鲂属鱼类形态差异分析. 淡水渔业, 2013, 43(3): 21 - 27.]
- [7] Hiroshi H, Petrino M G, Kakunagaa T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(21): 6465 - 6469.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176 - 183.
- [9] Tang S J, Li S F, Cai W Q. Development of microsatellite markers for blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* using 5'-anchored PCR [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(3): 971 - 974.
- [10] Li W T, Liao X L, Yu X M, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Molecular Ecology Resources, 2007, 7(5): 771 - 773.
- [11] Gao Z X, Luo W, Liu H, et al. Transcriptome analysis and SSR/SNP markers information of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e42637.
- [12] Gao D, Du F, Zhu Y Y. Low-background and high-resolution contracted silver-stained method in polyacrylamide gels electrophoresis [J]. Hereditas, 2009, 31(6): 668 - 673. [高东, 杜飞, 朱有勇. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法. 遗传, 2009, 31(6): 668 - 673.]
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 - 2739.
- [14] Fan J J, Bai J J, Li S J, et al. Establishment of dna fingerprinting and analysis on genetic structure of largemouth bass with microsatellite [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 600 - 609. [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析. 水生生物学报, 2012, 36(4): 600 - 609.]
- [15] Shi F, Xu N, Xiong M H, et al. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in an

- endemic Chinese cyprinid fish, *Pseudogyrincheilus prochilus*, and their cross-species amplification in two related species [J]. Conservation Genet Resour, 2009, 1(1):397-399.
- [16] Chen W M, Cheng Q. Development of thirty-five novel polymorphic microsatellite markers in *Pseudosciaena polyactis* (Perciformes: Sciaenidae) and cross-species amplification in closely related species, *Pseudosciaena crocea* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 47:111-115.
- [17] Yi S W, Huang H, Luo J, et al. Assessment of genetic variability and inter-specific relationships among four species of groupers (*Genus epinephelus*) from South China Sea using microsatellite markers [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(2):428-433. [尹绍武, 黄海, 骆剑, 等. 用微卫星标记研究南海四种石斑鱼的遗传变异与种间关系. 农业科学与技术, 2012, 13(2):428-433.]
- [18] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(1):1-5. [孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报). 中国水产科学, 2000, 7(1):1-5.]
- [19] Quan Y C, Sun X W, Liang L Q, et al. Identification of genetic polymorphism between three species of common carp using zebrafish *Danio rerio* microsatellite molecular markers [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2):300-304. [全迎春, 梁利群, 孙效文, 等. 斑马鱼微卫星分子标记检测鲤鱼种间多态性. 中国水产科学, 2006, 13(2):300-304.]
- [20] Wang J J, Yu X M, Zhao K, et al. Microsatellite development for an endangered bream *Megalobrama pellegrini* (Teleostei, Cyprinidae) using 454 sequencing [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(3):3009-3021.
- [21] Yi S K, Gao Z X, Luo W, et al. Cross-species amplification of *Megalobrama amblycephala* EST-SSR in *M. pellegrini* and identification of their reciprocal hybrids [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(7):970-973. [易少奎, 高泽霞, 罗伟, 等. 团头鲂 EST-SSR 在厚颌鲂中的跨种扩增及杂交 F₁ 的鉴定. 水产学报, 2013, 37(7):970-973.]
- [22] Luo W, Deng W, Yi S K, et al. Characterization of 20 polymorphic microsatellites for blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) from EST sequences [J]. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(2):499-501.
- [23] Yang H, Li D Y, Cao X, et al. Genetic potential analysis of six tilapia populations by microsatellite DNA markers [J]. Hereditas, 2011, 33(7):768-775. [杨弘, 李大宇, 曹祥, 等. 微卫星标记分析罗非鱼群体的遗传潜力. 遗传, 2011, 33(7):768-775.]
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3):314-331.
- [25] Xie N, Liu X Y, Feng X Y, et al. Sequences analysis on mitochondrial cytochrome b gene fragment of *Megalobrama* spp. [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2012(1):290-292. [谢楠, 刘新轶, 冯晓宇, 等. 鲂属鱼类细胞色素 b 基因片段序列分析. 现代农业科技, 2012(1):290-292.]

Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of different *Parabramis* and *Megalobrama* populations with microsatellite

ZHANG Qianqian, CHEN Jie, JIANG Xiayun, ZOU Shuming*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In the study, 18 pairs of primers which could give stable and polymorphic amplification profiles were screened out from 60 microsatellite loci and used to analyze the genetic structure of *Parabramis* and *Megalobrama* species. Meanwhile, the microsatellite DNA fingerprinting in six populations of genera *Parabramis* and *Megalobrama* was established based on the results of alleles of microsatellite loci by Popgen1.32 software package and illustrative patterns were constructed by EXCEL office software, including two geographic populations of *M. terminalis* from Dong River (SJF1) and Qiantang River (SJF2), *M. hoffmanni* (GDF), *M. pellegrini* (HHF), *M. amblycephala* (TTF) and *P. pekinensis* (CCB). The results showed that a total of 221 alleles were obtained from the six genera *Parabramis* and *Megalobrama* populations, and the alleles ranged from 2 – 20 in each locus. The mean value of number on alleles (N_a) of SJF1, SJF2, HHF, GDF, TTF and CCB was 5.17, 6.11, 3.5, 6.56, 5.22 and 5.22, the mean value of expected heterozygosity (H_e) was 0.6342, 0.7204, 0.5462, 0.6810, 0.6752 and 0.5597, and the average value of polymorphism information content (PIC) was 0.5756, 0.6669, 0.4720, 0.6306, 0.6064 and 0.5170, respectively. It demonstrated that the genetic diversity of SJF2 was the highest and HHF was the lowest among the six populations. Using unweighted pair-group method with arithmetic means method (UPGMA) based on their genetic distances, the cluster analysis in six populations showed that SJF2 and TTF first grouped together, genetic distance was 0.5606; then they clustered with SJF1, GDF, HHF, CCB in sequence; the genetic distance between HHF and CCB was 1.7592, which was the farthest. In addition, nine pairs of specific microsatellite markers (TTF1, TTF2, TTF3, TTF7, TTF10, Mam03, Mam25, EST37 and EST66) were screened from microsatellite DNA fingerprinting which could be used to identify most of genera *Parabramis* and *Megalobrama* populations. Particularly, microsatellite primers (Mam03 or EST37) could differentiate *P. pekinensis* (CCB) from genus *Megalobrama* populations and microsatellite markers (TTF3, EST37, TTF2/TTF10, EST66) combination could completely identify SJF1, HHF and GDF populations among *Megalobrama* spp. However, as a result of the relative consistency of the genetic characteristics, specific SSR markers, which could distinguish *M. terminalis* from Qiantang River (SJF2) and *M. amblycephala* (TTF), were not found. Overall, these results could provide a theoretical basis for germplasm conservation, species identification and genetic breeding of genera *Parabramis* and *Megalobrama* in China.

Key words: *Parabramis*; *Megalobrama*; microsatellite marker; DNA fingerprinting; genetic structure

Corresponding author: ZOU Shuming. E-mail: smzou@shou.edu.cn