

蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼遗传多样性的 AFLP 分析

王 定, 苏永全, 毛 勇, 徐 斌, 王 军*

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用选择性扩增片段长度多态性分子标记技术 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP), 分析了采自日本九州海域蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus thynnus*) 和台湾海域黄鳍金枪鱼 (*Thunnus albacares*) 野生群体的遗传多样性水平. 结果表明: 9 对选择性引物在 2 种金枪鱼中共扩增出 675 个位点 (100 ~ 750 bp), 其中蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼多态位点分别为 388 个和 368 个. 蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼的多态位点比例、Shannon 遗传多样性指数分别为 57.48 % 和 54.52 %, 0.330 1 和 0.301 8. AMOVA 分子方差分析显示: 种间遗传分化中, 83.79 % 的遗传变异由种间贡献, 而 16.21 % 的变异分布于种内个体之间. 同其他鱼类比较, 2 种金枪鱼显示了较为丰富的遗传多样性水平, 其种质资源处于较好的水平. 研究结果将为我国蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼的资源保护与合理利用提供重要的理论依据.

关键词: 蓝鳍金枪鱼; 黄鳍金枪鱼; AFLP; 遗传多样性; 种质资源

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)06-0890-05

金枪鱼 (*Thunnus*) 隶属于鲈形目 (Perciformes), 鲭亚目 (Scombroidei), 鲭科 (Scombridae), 具有高度洄游特性, 喜集群分布在太平洋、大西洋、印度洋的热带、亚热带和温带广阔水域, 在我国主要分布在东海和南海^[1]. 其中, 蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus thynnus*) 有“金枪鱼之王”的雅称; 黄鳍金枪鱼 (*Thunnus albacares*) 在世界金枪鱼类的产量中仅次于鲣 (*Katsuwonus pelamis*), 是金枪鱼属渔业产量最重要的经济鱼种^[2]. 但过度捕捞、气候因素影响导致部分金枪鱼资源出现相对萎缩现象^[3-4]. 近年来日本等国开始对蓝鳍金枪鱼的人工育苗进行研究, 一些沿海国家在野捕金枪鱼的蓄养方面获得成功. 不少学者对金枪鱼的渔业生物学、肌肉营养成分、染色体以及遗传多样性开展研究, 为金枪鱼的资源保护和可持续发展提供了科学资料^[5-10].

目前, 我国正大力开发远洋金枪鱼渔业, 而国内对金枪鱼的专项研究较少^[11-13], 不利于中国对各金枪鱼鱼种的研究与开发. 由此本课题组用 RAPD 和微卫星分子标记技术研究采自日本九州海域的蓝鳍金枪鱼的群体遗传多样性^[14]. 此次试验则进一步以 AFLP 分子标记技术分析、评估了日本九州海域的蓝鳍金枪鱼和台湾海域的黄鳍金枪鱼野生群体的遗传多样性和种质资源现状, 研究结果将为我国蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼的资源保护与合理利用提供重要的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材 料

实验所用蓝鳍金枪鱼 72 尾, 2006 年 4 月采自日本九州海域, 平均叉长 (73.97 ± 3.24) cm, 平均体质量 (9.24 ± 1.20) kg; 黄鳍金枪鱼 44 尾, 2006 年 9 月取自台湾海域, 平均叉长 (36.58 ± 2.61) cm, 平均体质量 (0.81 ± 0.19) kg.

1.2 基因组 DNA 提取

随机抽取每个群体各 30 尾个体, 参照文献^[15], 用蛋白酶 K + 苯酚/氯仿法从金枪鱼背部肌肉 (90 % 乙醇、-20 °C 保存) 提取基因组 DNA, 经 1 % 琼脂糖凝胶电泳筛选完整、无降解的 DNA 样品, -20 °C 保存待用.

1.3 AFLP 分析及聚丙烯酰胺凝胶电泳

硬骨鱼类基因组较为复杂, 为 $10^8 \sim 10^{10}$ bp, 因此采用 Vos 二步扩增策略^[16], 用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测双酶切基因组 DNA 的二次扩增产物, 获得 DNA 指纹图谱. 用限制性内切酶 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切, 加入接头连接后, 先用一组 3 末端加 1 个选择性碱基的预扩增引物进行扩增, 其序列分别为 *EcoR* I + A (5'-GACTGCGTACCAATTTC + A-3') 和 *Mse* I + C (5'-GATGAGTCCTGAGTAA + C-3'), 将产物稀释, 再经预实验从 16 对引物中筛选出 9 对引物进行选择性的扩增以供 AFLP 分析. 选择性扩增引物的 3 末

收稿日期: 2009-02-26

基金项目: 福建省科技重大专项 (2004NZ03) 资助

* 通讯作者: junw@xmu.edu.cn

表 1 选择性扩增引物名称及序列

Tab. 1 Selective amplification primers and their sequences used in AFLP analysis

引物名称	<i>Eco</i> R I 引物(5'-3')	引物名称	<i>Mse</i> I 引物(5'-3')序列
E1	GACTGCGTACCAATTC AAC	M1	GATGA GTCCTGA GTAA CAC
E2	GACTGCGTACCAATTC AGC	M2	GATGA GTCCTGA GTAA CTG
E3	GACTGCGTACCAATTC ACG	M3	GATGA GTCCTGA GTAA CCA
E4	GACTGCGTACCAATTC ATG		

端加 3 个选择性碱基,其序列和组合见表 1、2. 扩增产物在 6 %聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染后统计条带.

1.4 数据处理

根据电泳结果,在聚丙烯酰胺凝胶相同的迁移位置,按每 1 个扩增带标记的有无,出现扩增带记为“1”(包括弱的标记),无扩增带记为“0”.利用 POPGENE 1.32 软件统计位点总数、多态位点数和每个引物组合的多态位点比例、Shannon 多样性指数、遗传分化系数(G_{st})和遗传距离.利用 AMOVA 分子方差分析计算出种间遗传变异固定指数(F_{st}),估计种间遗传分化情况.

2 结 果

2.1 AFLP 扩增结果

本实验利用筛选的 9 对引物对蓝鳍金枪鱼和黄鳍

金枪鱼野生群体各 30 个个体进行扩增,共检测到 675 条片段大小在 100 ~ 750 bp 之间清晰可辨的条带,每对引物检出的多态片段为 35 ~ 54 条,多态片段比例从 48.24 %~ 64.81 %不等,表现出 AFLP 较高的检出率和丰富的信息量.扩增条带数和多态性条带比例的统计结果显示不同的引物组合扩增的结果略有差异(表 2).

2.2 2 种金枪鱼的遗传多样性

由表 2 数据可知,9 对选择性扩增引物在蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼野生群体中分别扩增出 388 和 368 个位点,平均多态百分率和 Shannon 遗传多样性指数分别为 57.48 %、0.330 1 和 54.52 %、0.301 8 ($p > 0.05$),蓝鳍金枪鱼多态位点比例及 Shannon 多样性指数均高于黄鳍金枪鱼,但相差不明显.

2.3 种间的遗传分化

扩增出的 675 个位点中有 81 条共有位点,94 个种群特异位点,即有 94 个位点在 2 种金枪鱼中出现全

表 2 9 对引物组合从黄鳍金枪鱼和蓝鳍金枪鱼检出的扩增片段总数、多态位点数及其比例

Tab. 2 Number of fragments ,percent polymorphic loci ,polymorphic rate of yellowfin tuna (*Thunnus albacare*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) using 9 pairs of primers

引物组合	扩增位点数	多态位点数		多态位点比例/ %	
		蓝鳍金枪鱼	黄鳍金枪鱼	蓝鳍金枪鱼	黄鳍金枪鱼
E1/ M1	68	42	36	61.76	52.94
E1/ M2	84	49	41	58.33	48.81
E1/ M3	76	39	43	51.32	56.58
E2/ M1	71	42	39	59.15	54.93
E2/ M2	85	47	41	55.29	48.24
E2/ M3	54	35	35	64.81	64.81
E3/ M1	70	44	40	62.86	57.14
E3/ M2	89	54	54	60.67	60.67
E4 / M1	78	42	48	53.84	61.54
总数	675	388	368		
平均值	75	43	39.56	57.48	54.52

表 3 蓝鳍金枪鱼和黄鳍金枪鱼的遗传学参数

Tab.3 Parameters of genetic diversity for two tested tuna populations

种类	Nei 基因多样性指数	Shannon 遗传多样性指数	基因分化系数 G_{st}	遗传变异固定指数 F_{st}
蓝鳍金枪鱼	0.2309	0.3301	0.7921	0.8379
黄鳍金枪鱼	0.2185	0.3018		0.1621

部扩增或完全无扩增 2 种情况:其中黄鳍金枪鱼有 43 个特异性标记,蓝鳍金枪鱼有 51 个特异性 AFLP 标记.表 3 显示,基因分化系数 $G_{st} = 0.7921$,表明 79.21 % 的遗传变异来自于种间,23.46 % 的变异来自于种内. AMOVA 分子方差分析显示,83.79 % 的遗传变异由种间贡献,而 16.21 % 的变异分布于群体内个体之内. F_{st} 与 G_{st} 值略有偏差,可能是软件计算方法不同所致.

3 讨 论

3.1 AFLP 技术在金枪鱼遗传多样性研究中的应用

目前,研究生物 DNA 水平遗传多样性的方法主要有 SSR^[17]、RAPD^[18]、AFLP^[19] 等. Han 等利用 AFLP 技术评估两种鲈与 3 种金枪鱼间的遗传多样性,认为 AFLP 较好区分两个近缘种,是一种评估鱼类种内及种间遗传多样性的有用工具^[20]. 本研究利用 9 对引物进行 AFLP 分析太平洋黄鳍和蓝鳍金枪鱼的遗传多样性,获得了 675 个清晰、稳定的条带,平均每对引物扩增出 75 个位点,每个引物组合在各金枪鱼中检测的多态性位点在 35~54 条之间不等,多态百分比为 48.24 %~64.81 %,发现了群体间的遗传差异,表明 AFLP 分子标记技术可用于种群遗传学的分析.

3.2 2 种金枪鱼遗传多样性分析

太平洋蓝鳍金枪鱼的平均多态性位点比例、Shannon's 信息指数分别为 57.48 % 和 0.3301,而黄鳍金枪鱼分别为 54.52 % 和 0.3018. 这与 Han 等^[20] 利用 AFLP 技术研究大西洋黄鳍金枪鱼和蓝鳍金枪鱼的遗传多样性水平相符合, Han 等通过 3 % 的琼脂糖电泳,利用 23 对引物组合共检出大西洋黄鳍金枪鱼多态性位点 193 个,大西洋蓝鳍金枪鱼多态性位点 180,其平均多态位点均为 57 %,表明了大西洋与太平洋蓝鳍和黄鳍金枪鱼的遗传多样性水平相当,均处于较高水平.

这可能是金枪鱼属于远洋性洄游鱼类,能进行远距离洄游,两大洋间两种金枪鱼种群间的基因交流没有受到阻碍所致. 此次实验结果也与本实验室利用 RAPD 和微卫星分子标记分析的日本九州海域蓝鳍金枪鱼的群体遗传多样性水平相一致^[14],说明太平洋蓝鳍金枪鱼的群体遗传多样性仍处于较高水平,具有一定的遗传变异潜力.

遗传变异是生物多样性的核心,分为种群内和种群间的变异,保持这两种变异可以最大限度地降低地理群体的灭绝几率,维持物种的稳定. 本文利用 G_{st} 、Shannon 遗传多样性指数和 AMOVA 分析等 3 种方法分析了太平洋蓝鳍和黄鳍金枪鱼的遗传多样性. Nei^[21] 认为当 G_{st} 值接近于 1 时,总遗传多样性主要存在于各群体之间. 本研究中 G_{st} 为 0.7921,种间遗传分化明显. 根据 Wright^[22] 对 F_{st} 的大小与分化程度的关系,当 $F_{st} > 0.15$,则差异显著. 本实验 F_{st} (0.8379) 大于 0.15 ($p < 0.05$, 差异显著),表明蓝鳍和黄鳍金枪鱼有一定的遗传分化.

AFLP 分子标记中检测出的多态性条带比例为衡量鱼类种群或群体的遗传多样性提供了比较和判断尺度^[23]. 我们将太平洋蓝鳍和黄鳍金枪鱼 AFLP 检测数据与已有的其他经济品种相比,两种金枪鱼的多态位点均高于 Xu 等^[24] 研究的 4 个地理群体日本比目鱼 (44.31 %~36.69 %)、张全启等^[25] 研究的牙鲆野生群体 (46.18 %)、韩志强等^[26] 研究的黄姑鱼青岛群体 (51.70 %) 及厦门群体 (51.99 %)、叶卫等^[27] 研究的鲢 (*Cirrhinus molitorella*) (41.5 %)、马洪雨等^[28] 研究的条斑星鲈 (*Veras permoseri*) 大连群体 (23.29 %) 及烟台群体 (41.10 %) 的多态百分率. 与 Liu 等^[29] 研究的野生牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) (60.92 %~65.78 %)、王志勇等^[30] 研究的野生真鲷 (*Pagrus major*) (58.4 %~64 %)、Chen 等^[31] 研究的半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) (40 %~77 %) 多态百分率相持平. 表明太平洋野生蓝鳍和黄鳍金枪鱼的遗传多样性仍处于较高水平,反映了此次研究对象具较大的基因库容量,其种质资源处于较好的水平.

但最近的研究发现,蓝鳍金枪鱼的亲鱼的资源量明显的下降,且 2001 年的评估认为补充量比 1980 年的 46 %~48 % 还少,并将处于长期下降趋势^[32],金枪鱼资源量的缩小,遗传的均质化或遗传多样性的枯竭将会对金枪鱼海洋渔业带来灾难性的后果. 尽管本研究表明太平洋蓝鳍和黄鳍金枪鱼野生群体遗传多样性

仍然处于较高的水平,但今后仍应该加强对太平洋蓝鳍和黄鳍金枪鱼种质资源的管理与保护,避免其过度开发造成资源枯竭,以保证金枪鱼远洋渔业的可持续发展。

参考文献:

- [1] 赵传细,陈思行.金枪鱼类和金枪鱼渔业[M].北京:海洋出版社,1983.
- [2] 孟晓梦,叶振江,王英俊.世界黄鳍金枪鱼渔业现状和生物学研究进展[J].南方水产,2007,3(4):74-79.
- [3] 黄斌.世界主要金枪鱼类资源状况与管理[J].现代渔业信息,2008,23(1):22-25.
- [4] 沈长春,苏新红,戴天元.世界主要经济金枪鱼的资源概况[J].福建水产,2006,6(2):81-91.
- [5] Broughton R E,Gold J R. Microsatellite development and survey of variation in northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) [J]. Mol Mar Biol Biotechnol,1997,6:308-314.
- [6] Takeyama H,Chow S,Tsuzuki H,et al. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification[J]. Journal of Fish Biology,2001,58:1646-1657.
- [7] Chow S,Inoue S. Intra-and interspecies restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus tuna* species[J]. Bulletin of the National Research Institute of Far Seas Fisheries,1993,30:207-225.
- [8] Terol J,Mascarell R,Fernandez-Pedrosa V,et al. Statistical validation of the identification of tuna species:bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences[J]. Agr Food Chem,2002,50:963-969.
- [9] Ward R D. Population genetics of tunas [J].Journal of Fish Biology,2006,47:259-280
- [10] Scoles D R,Graves J E. Genetic analysis of the population structure of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), from the Pacific Ocean[J]. Fish Bull U S,1993,63:690-698.
- [11] 刘秋狄,叶振江,刘元刚.南方蓝鳍金枪鱼渔业和生物学的研究进展[J].海洋科学,2007,31(12):88-94.
- [12] 郭文路,黄硕琳,曹世娟.世界南方蓝鳍金枪鱼渔业的资源状况与管理[J].海洋经济,2003,20(3):25-31.
- [13] 邵青,唐衍力.大西洋金枪鱼渔业现状分析[J].海洋湖沼通报,2005(3):66-72.
- [14] 邱凡,苏永全,傅蒙娜,等.太平洋蓝鳍金枪鱼野生群体遗传多样性的初步研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2008,47(4):585-590.
- [15] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [16] Vos P,Hogers R,Bleeker M,et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res,1995,23(21):4407-4414.
- [17] 马洪雨,岳永生,于燕,等. 鲤微卫星引物对麦穗鱼的适用性初步研究[J]. 水生生物学报,2007,31(2):278-281.
- [18] Salhi Hannachi A,Chat ti K,Saddoud O,et al. Genetic diversity of different Tunisian fig (*Ficus carica* L.) collections revealed by RAPD finger prints [J]. Hereditas,2006,143:15-22.
- [19] Liu Y G,Chen S L,Li B F,et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Biochemical Systematics and Ecology,2005,33:993-1005.
- [20] Han K,Ely B. Use of AFLP analyses to assess genetic variation in morone and thunnus species [J]. Marine Biotechnology,2002,4:141-145.
- [21] Masatoshi Nei,Aravinda Chakravarti. Drift variances of F_{ST} and G_{ST} statistics obtained from a finite number of isolated populations [J]. Theoretical Population Biology,1977,11(3):307-325.
- [22] Wright S. The genetical structure of populations[J]. Annals of Eugenics,1951,15:323-334.
- [23] 王志勇,王艺垒,林利明,等. 福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性研究[J]. 中国水产科学,2002,9(3):198-202.
- [24] Xu Xiaofei,Zhang Quanqi,Wang Zhigang,et al. Assessing genetic diversity of wild populations of Japanese flounder using AFLP markers [J]. Acta Oceanologica Sinica,2006,25(3):82-89.
- [25] 张全启,徐晓斐,齐杰,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] 韩志强,高天翔,王志勇,等. 黄姑鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 水产学报,2006,30(5):640-646.
- [27] 叶卫,符云,朱彩艳,等. 鲮原种群体的 AFLP 分析[J]. 南方水产,2007,3(3):57-61.
- [28] 马洪雨,陈松林,田永胜,等. 我国引进条斑星鲷群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 水产学报,2008,32(3):321-326
- [29] Liu Y G,Chen S L,Li B F,et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Bioch System Ecol,2005,33(10):993-1005.

- [30] 王志勇,王艺垒,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和趋异[J]. 水产学报, 2001,25(4):289-293.
- [31] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Mar Biotechnol, 2007, 9(2):273-280.
- [32] 谢营梁, 编译. 中西太平洋四种金枪鱼种类的渔业现状(3) [J]. 现代渔业信息, 2002, 17(11):17-21.

Genetic Diversity of *Thunnus thynnus* and *Thunnus albacares* Stocks by AFLP

WANG Ding, SU Yong-quan, MAO Yong, XU Bin, WANG Jun *

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Thunnus* is a important commercially marine fish species, which is widely distributed. *Thunnus* has been intensively studied in China, including its basic biological characteristics in fishery and artificial reproduction. However, very few studies on *Thunnus* were focused on genetic diversity, which has become an obstacle to further researches on the protection, management, rational exploitation and sustainable utilization of *Thunnus* resources. The genetic diversity of wild Pacific blue-fin tuna (*Thunnus thynnus*) and Pacific yellow-fin tuna (*Thunnus albacares*) were investigated by using amplified fragment length polymorphic (AFLP) in the present paper. AFLP fingerprinting was regarded as one of the most useful techniques in nowadays for DNA fingerprint analysis. The results showed that a total of 675 DNA amplification bands ranging from 100 ~ 750 bp were produced using 9 pairs of primer combinations, and 35 ~ 54 polymorphic loci were detected per primer combination. The percentage of polymorphic loci and Shannon's information index of the blue-fin and yellow-fin tuna were 57.48%, 0.330 1 and 54.52%, 0.301 8, respectively. Both populations were at the same high level of genetic diversity. AMOVA analysis (83.79%) indicated that a certain extent of differentiation in two species. There were 83.79% of variance was among the populations and 16.21% of variance was within a population. Compared with other fishes, both tuna species possessed rich population genetic diversities. The information of genetic diversities in different populations will give us theoretical guidance in breeding and genetic improvement.

Key words: *Thunnus thynnus*; *Thunnus albacares*; AFLP; genetic variation; genetic resources