

侯新远,张洪伟,尹绍武,等. 利用 SRAP 分子标记研究河川沙塘鳢群体的遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):37-40.

利用 SRAP 分子标记研究河川沙塘鳢群体的遗传多样性

侯新远,张洪伟,尹绍武,张丽娟,胡亚丽

(南京师范大学生命科学学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,江苏南京 210023)

摘要:利用相关序列扩增多态性 SRAP 分子标记对 3 个河川沙塘鳢 (*Odontobutis potamophila*) 自然群体[安徽省当涂(DT)群体、浙江省余姚(YY)群体、江苏省太湖东西山(DXS)群体]进行了遗传多样性分析。从 196 对引物组合中筛选出 11 对扩增条带清晰、稳定的引物组合对 3 个群体进行扩增,共获得 71 个位点;3 个群体内多态位点占比为 6.90%~24.14%,其中 DT 群体多态位点占比为 6.90%,YY 群体多态位点占比为 24.14%、DXS 群体多态位点占比为 24.14%;群体的 Nei's 基因多样性指数(H)为 0.033 0~0.093 9[DT(0.033 0) < YY(0.078 4) < DXS(0.093 9)],群体 Shannon's 多样性指数(I)为 0.046 3~0.136 8[DT(0.046 3) < YY(0.120 6) < DXS(0.136 8)]。可见 DXS 群体、YY 群体的多态位点占比、Nei's 基因多样性、Shannon's 多样性指数均稍高于 DT 群体。研究还发现,3 个群体间的 Nei's 无偏遗传距离为 0.036 3~0.286 7,遗传相似度为 0.750 7~0.964 4,DXS 群体与 YY 群体的遗传距离最小(0.036 3),遗传相似度最大(0.964 4),亲缘关系最近。采用 UPGMA 法对 3 个群体进行聚类分析显示,YY 群体和 DXS 群体聚为 1 支,DT 群体聚为单独的 1 支。综合试验结果表明,3 个河川沙塘鳢自然群体的遗传多样性较低。

关键词:河川沙塘鳢;相关序列扩增多态性;遗传多样性;多样性指数

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)10-0037-03

河川沙塘鳢 (*Odontobutis potamophila*) 属鲈形目 (Perciformes) 虾虎鱼亚目 (Gobioidei) 沙塘鳢科 (Odontobutidae) 沙塘鳢属 (*Odontobutis*), 广泛分布在我国长江中下游 (湖北荆州至上海江段) 及其沿江各支流、钱塘江水系、闽江水系, 为我国小型淡水底栖肉食性鱼类^[1-2]。河川沙塘鳢营养价值高, 深受人们喜爱, 是一种很有开发前景的小型经济鱼类。在 2012 年世界自然保护联盟 (IUCN) 红色名录中, 河川沙塘鳢被评级为信息缺乏物种。近年来, 由于过度捕捞、环境破坏及人类其他活动, 导致其自然资源受到极大的破坏, 从而对其种群遗传结构产生一定影响。国内外关于河川沙塘鳢的报道多集中在其人工繁殖、生物学特性、病害防治等方面^[3-13], 关于其种质资源利用和资源保护等方面的报道较少, 仅有 Hou 等采用线粒体 DNA (D-loop) 序列对河川沙塘鳢的群体进行遗传多样性研究^[14], 李妍等采用 ISSR 分子标记对江苏常熟河川沙塘鳢个体大小不一的 2 个群体遗传差异性进行研究^[15]。相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种新型的旨在扩增开放阅读框 (ORFs) 的分子标记技术^[16], 该分子标记具有简单、高效、稳定、重复性高、产率高和多态性较丰富等特点, 目前广泛应用于植物种质鉴定、基因定位、遗传多样性分析和图谱构建^[17-20]。目前在水产研究

中已用于罗氏沼虾^[21]、海南沼虾^[22]、草鱼^[23]、暗纹东方鲀^[24]、团头鲂^[25]、彩鲤^[26]、乌苏里拟鲃^[27]、文蛤^[28] 的遗传多样性研究。本研究采用 SRAP 分子标记对 3 个群体的河川沙塘鳢遗传多样性进行分析, 以期了解河川沙塘鳢种质资源现状及种群间的遗传分化情况, 为河川沙塘鳢种质资源保护和开发利用提供参考资料。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

试验所用样品分别采自安徽省当涂县运粮河流域 (简称 DT, 31°25'37"N, 118°42'59"E)、浙江省余姚市姚江流域 (简称 YY, 30°0'16.49"N, 121°3'6.33"31°25'37"E)、江苏省太湖靠近东西山侧水域 (简称 DXS, 30°59'58.16"N, 120°27'21.02"E), 每个种群采集 8 尾, 将尾鳍保存于无水乙醇中 (-20℃) 备用。

1.2 基因组 DNA 提取

采用常规苯酚-氯仿抽提法^[29]从鳍条组织中提取基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 放入 -20℃ 冰箱储存备用。

1.3 SRAP-PCR 反应

根据已发表的 SRAP 通用引物, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成正、反向引物各 14 个 (表 1), 将它们随机配对构成 196 对不同引物组合, 用于 PCR 扩增, 筛选出带型清晰、稳定、多态性较好的引物组合用于进一步试验。25 μL SRAP-PCR 反应体系为: 10 × buffer 2.5 μL (含 Mg²⁺), 2 mmol/L dNTPs 2.5 μL, 10 mmol/L 正/反向引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA 酶 0.2 μL, 基因组 DNA 1 μL, 不足部分用灭菌双蒸水补齐。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 35℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 5 个循环; 94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

收稿日期: 2014-01-20

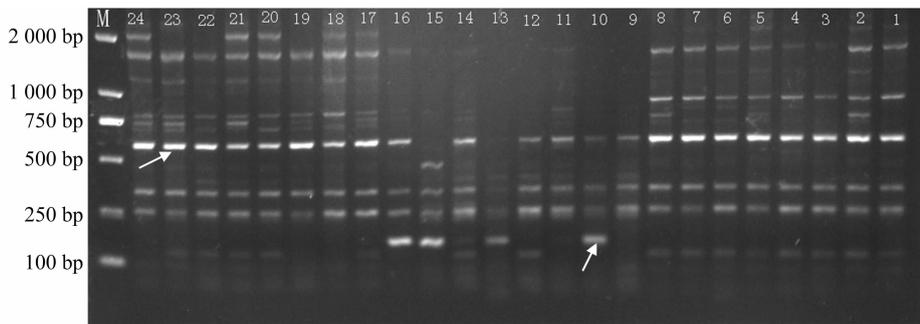
基金资助: 国家星火计划 (编号: 2013GA690166); 江苏省科技支撑计划 (农业) 项目 (编号: BE2013441); “江苏省六大人才高峰” 高层次人才项目 (编号: NY-032); 江苏省农业科技自主创新资金 [编号: CX(11)1037]; 南京师范大学科技成果转化基金 (编号: 2013-02); 江苏省扬州市农业科技攻关计划 (编号: 2012074); 。

作者简介: 侯新远 (1988—), 女, 山西阳泉人, 硕士研究生, 从事鱼类种质资源与遗传育种研究。E-mail: houxinyuan1988@126.com。

通信作者: 尹绍武, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事鱼类种质资源与遗传育种研究。E-mail: yinshaowu@163.com。

表1 用于河川沙塘鳢遗传多样性分析的SRAP引物序列

引物编号	正向引物序列 (5'→3')	引物编号	反向引物序列 (5'→3')
F1	TGAGTCCAAACCGGATA	R1	GACTGCGTACGAATTAAT
F2	TGAGTCCAAACCGGAGC	R2	GACTGCGTACGAATTTGC
F3	TGAGTCCAAACCGGAAT	R3	GACTGCGTACGAATTGAC
F4	TGAGTCCAAACCGGACC	R4	GACTGCGTACGAATTGTA
F5	TGAGTCCAAACCGGAAG	R5	GACTGCGTACGAATTGCA
F6	TGAGTCCAAACCGGTAA	R6	GACTGCGTACGAATTCAG
F7	TGAGTCCAAACCGGTCC	R7	GACTGCGTACGAATTCCA
F8	TGAGTCCAAACCGGTGC	R8	GACTGCGTACGAATTAGC
F9	TGAGTCCAAACCGGATC	R9	GACTGCGTACGAATTCTG
F10	TGAGTCCAAACCGGATG	R10	GACTGCGTACGAATTCGA
F11	TGAGTCCAAACCGGACA	R11	GACTGCGTACGAATTAAC
F12	TGAGTCCAAACCGGTGT	R12	GACTGCGTACGAATTCAA
F13	TGAGTCCAAACCGGTCA	R13	GACTGCGTACGAATTGGT
F14	TGAGTCCAAACCGGCTA	R14	GACTGCGTACGAATTGTC



1~8: DT个体; 9~16: YY个体; 17~24: DXS个体; 箭头所示为部分多态性条带; M为分子量标记。图2同。

图1 引物组合 F3R10 在 3 个群体中的扩增图谱

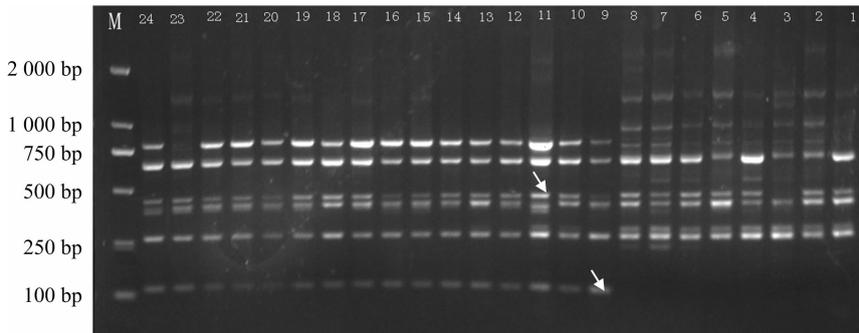


图2 引物组合 F11R12 在 3 个群体中的扩增图谱

表2 河川沙塘鳢不同SRAP引物组合的多态性位点数

引物组合	位点总数 (个)	引物组合	位点总数 (个)
F2R3	11	F4R4	6
F2R8	6	F6R9	5
F2R12	6	F9R11	5
F3R3	7	F11R12	6
F3R5	4	F12R8	8
F3R10	7		

记录扩增出的在 100 ~ 750 bp 之间的条带数(即位点数),发现每对引物组合扩增的位点数为 4 ~ 11 个。扩增位点最多的引物组合是 F2R3,扩增位点数为 11 个;扩增位点最少的引物组合是 F3R5,扩增位点数为 4 个。

1.4 数据分析

根据 SRAP 扩增电泳图谱,将每条带视为 1 个位点,对每个样品 SRAP 扩增带的有无进行统计,有带记为 1,无带记 0,将电泳图谱转换成数字矩阵。采用 POPGENE 1.32 计算群体的 Shannon's 信息指数(I)、Nei's 基因多样性(H),统计不同引物组合对不同群体的多态位点百分率(P),计算 Nei's 无偏遗传距离(D)和遗传相似度(S),并根据遗传距离构建 3 个群体的 UPGMA 聚类图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物的筛选及扩增图谱

利用河川沙塘鳢 3 个群体的 DNA 对 196 对 SRAP 引物组合进行筛选,其中 11 个引物组合(F2R3、F2R8、F2R12、F3R3、F3R5、F3R10、F4R4、F6R9、F9R11、F11R12、F12R8)得到稳定、可重复、多态性好的扩增图谱(图 1、图 2、表 2)。

2.2 群体遗传多样性分析

表 2 中 11 对引物组合在 24 尾河川沙塘鳢个体中共扩增出 71 个位点,由表 3 对各群体遗传参数的比较发现:YY 群体和 DXS 群体多态位点占比最大,为 24.14%;DT 群体最小,为 6.90%。此外还可看出,Nei's 基因多样性(H)由大到小依次为 DXS 群体(0.093 9)、YY 群体(0.078 4)、DT 群体(0.033 0);Shannon's 多样性指数(I)由大到小依次为 DXS 群体(0.136 8)、YY 群体(0.120 6)、DT 群体(0.046 3)。整体结果可以看出,DXS 群体、YY 群体的多态位点占比、Nei's 基因多样性和 Shannon's 多样性指数均稍高于 DT 群体。

2.3 群体遗传距离和遗传相似度

依据 Nei 的方法由各位点等位基因频率计算河川沙塘鳢 3 个群体间的 Nei's 无偏遗传距离(D)、遗传相似度(S),结果

表3 河川沙塘鳢3个群体SRAP扩增位点的多态性和遗传多样性参数

群体	多态位点占比(%)	Nei's 基因多样性(<i>H</i>)	Shannon's 信息指数(<i>I</i>)
DT	6.90	0.033 0	0.046 3
YY	24.14	0.078 4	0.120 6
DXS	24.14	0.093 9	0.136 8

见表4。可以看出,DT群体与YY群体间的遗传距离最大(0.286 7),遗传相似度最小(0.750 7);DXS群体与YY群体的遗传距离最小(0.036 3),遗传相似度最大(0.964 4)。UPGMA聚类图显示,YY群体和DXS群体聚为1支,DT群体单独聚为1支(图3)。

表4 河川沙塘鳢群体间的Nei's无偏遗传距离*D*(对角线下方)和遗传相似度*S*(对角线上方)

群体	DT	YY	DXS
DT		0.750 7	0.765 7
YY	0.286 7		0.964 4
DXS	0.267 0	0.036 3	

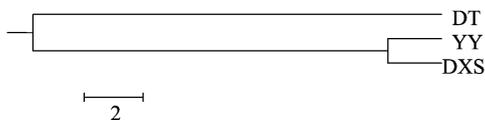


图3 基于Nei's无偏遗传距离构建的河川沙塘鳢3个群体的UPGMA聚类图

3 讨论与结论

遗传多样性作为生物多样性的的重要组成部分,是物种多样性、生态系统多样性和景观多样性的基础,也是生命进化和适应的基础;种内遗传多样性越丰富,物种对环境变化的适应能力也越大。通常认为多态位点比率、Nei's基因多样指数和Shannon's信息指数是衡量群体遗传多样性的常用指标。本研究中3个河川沙塘鳢群体的多态位点占比在6.90%~24.14%间,Nei's基因多样指数为0.033 0~0.093 9,Shannon's信息指数在0.046 3~0.136 8间。与其他水产动物的SRAP数据比较发现,3个群体的多态位点占比低于程长洪等研究的暗纹东方鲀群体(54.98%~58.87%)^[24],冉玮等研究的3个地理群体团头鲂(29.07%~58.14%)^[25],贾永义等研究的翘嘴红鲌群体(50.00%)、团头鲂群体(46.32%)^[30],张志伟等研究的江苏南通文蛤(57.81%)^[28];周幼松等研究的罗氏沼虾(55.6%~64.1%)^[21];张慧研究的大麻哈鱼(73.75%)^[31],可见河川沙塘鳢的遗传多样性目前仍处于比较低的水平,与Hou等用D-loop基因序列研究不同群体的河川沙塘鳢遗传多样性结果^[14]一致。这可能与第四纪冰川有关,冰期使得很多淡水鱼都遭受了灾难性毁灭,河川沙塘鳢也难逃厄运,受到严重的破坏,只有少数幸存下来。除了历史原因,近年来环境恶化、生态栖息地被破坏、水利修建、人类过度滥捕等因素也导致河川沙塘鳢数量锐减。

遗传相似度和遗传距离从一定程度上衡量了种群间遗传差异程度^[32]。本研究对各群体进行遗传结构分析结果表明,

DT群体与YY群体间的遗传距离最大(0.286 7),遗传相似度最小(0.750 7),DXS群体与YY群体的遗传距离最小(0.036 3),遗传相似度最大(0.964 4),亲缘关系最近,同时UPGMA聚类图显示YY群体和DXS群体聚为1支,DT群体聚为单独的1支,与mtDNA控制区序列分析得出的DXS群体与YY群体的遗传距离最小的结果一致^[14]。从地理位置上看,DXS群体的地理位置与YY群体的地理位置较近,客观上增加了2个群体的遗传相似度。

本研究结果显示,河川沙塘鳢的遗传多样性低,为了恢复河川沙塘鳢渔业资源,在加强对其保护、保护其产卵场和改善水域环境条件的同时,应该严格设立禁捕期、限制捕捞器械规格,同时加强人们对渔业资源保护的意识,在明确遗传结构的基础上,加强河川沙塘鳢人工养殖的研究和推广,从而减轻人类对野生资源的捕捞压力,缓解市场需求。同时应选择等位基因数多、杂合度较高、亲缘关系接近天然个体的群体进行人工放流,从而恢复野生河川沙塘鳢资源。

参考文献:

- [1]伍汉霖,钟俊生. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲈形目(五) 虾虎鱼亚目[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [2]Iwata A, Jeon S R, Mizuno N, et al. A revision of the eleotrid goby genus *Odontobutis* in Japan, Korea and China[J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1985, 31(4): 373-388, 128.
- [3]顾建华,孟艳玲,吕军开,等. 河川沙塘鳢卵母细胞发育过程中卵黄脂磷蛋白的变化[J]. 水产科学, 2007, 26(1): 43-47.
- [4]徐忠源,王新荣,骆小年,等. 不同开口饵料对鸭绿沙塘鳢仔鱼生长性能的影响[J]. 水产学杂志, 2010, 23(1): 28-31.
- [5]赵军,盛劲东. 河川沙塘鳢的人工繁殖与集约化苗种培育技术[J]. 水产养殖, 2011, 32(6): 17-18.
- [6]苏志烽,王建民,丁彩霞,等. 蟹池套养沙塘鳢新技术[J]. 中国水产, 2009(5): 38-39.
- [7]翁敏婵,郭莎园,胡先成. 河川沙塘鳢早期发育过程中耗氧率及NH₃-N排泄率的变化[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版, 2010, 27(5): 14-18.
- [8]罗颖,胡先成,翁敏婵. 河川沙塘鳢孵化腺的超微结构[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版, 2009, 26(4): 20-24.
- [9]胡先成. 河川沙塘鳢仔、稚、幼鱼的发育阶段及生长的研究[J]. 重庆师范学院学报:自然科学版, 1996, 13(2): 10-15.
- [10]孙帼英,郭学彦. 太湖河川沙塘鳢的生物学研究[J]. 水产学报, 1996, 20(3): 193-202.
- [11]张根玉,施永海,张海明,等. 河川沙塘鳢养殖技术①河川沙塘鳢的生物学特性及市场前景[J]. 水产科技情报, 2012, 40(3): 123-127, 131.
- [12]周志明,曹铮,沈锦玉,等. 河川沙塘鳢致病真菌的特性及分子生物学鉴定[J]. 淡水渔业, 2011, 41(2): 69-72.
- [13]熊良伟,孙继真,叶建生. 几种药物对沙塘鳢水霉病的室内防治实验[J]. 渔业致富指南, 2009(16): 58-60.
- [14]Hou X Y, Zhu F, Yin S W, et al. Genetic diversity of *Odontobutis potamophila* from different geographic populations inferred from mtDNA control region[J/OL]. Mitochondrial DNA, (2013-07-10) [2013-12-01]. doi:10.3109/19401736.2013.803084.
- [15]李妍,荣楠,徐建荣,等. 河川沙塘鳢的ISSR分析[J]. 安徽农业科学, 2010(2): 606-608.

叶 巍. 乳酸菌 DNA 序列分析与功能基因研究现状[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 40-41.

乳酸菌 DNA 序列分析与功能基因研究现状

叶 巍^{1,2}

(1. 上海医疗器械高等专科学校, 上海 200093; 2. 上海理工大学, 上海 200433)

摘要:乳酸菌在食品发酵中得到广泛的应用,被认为是加强健康食品生产的益生菌。关于多种乳酸菌的基因组测序和功能基因组的研究加快了对乳酸菌多样性和进化的理解,并且揭示了重要特性的分子基础。随着目标试验的证实、代谢工具的开发、网络工具的利用,生物信息学工具以及数据库重新构建代谢途径为食品和饲料菌种提供了新的开发途径。

关键词:乳酸菌;基因组;生物信息学;多样性;代谢重建

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0040-02

含有乳酸菌的发酵剂,如乳杆菌、乳球菌等,对于很多食物如牛奶、肉类、蔬菜、谷类的发酵起重要作用。这些菌种发酵主要产生有防腐作用的乳酸,影响产品的风味及质地^[1-3]。乳酸菌在发酵中还有其他重要的功能,人们在不同的环境中发现了各种特性的菌种^[4-6]。随着乳酸菌基因组数据的公布,生物信息学对乳酸菌功能特性研究作用越发重要。本研究介绍了乳酸菌 DNA 序列分析与功能基因研究现状,旨在为开发利用乳酸菌资源提供依据。

1 基因组、质粒

乳酸菌全基因组大小相对一致,约为 1.8~2.6 Mb,植物乳杆菌全基因组大小约为 3.3 Mb。过去 20 年,分子遗传学家一直青睐的不含质粒的 *L. lactis* ssp. *Cremoris* MG1363 测序已经完成。通过将其与 *L. lactis* ssp. *Lactis* IL1403 染色体共线性绑定,以非常相近的菌种或菌种的全基因组为模板完成原核基因组定位。对 *Lactobacillus brevis* KB290 的 9 个质粒测序分析表明, *L. brevis* KB290 有很好的稳定性^[7]。乳酸菌特别是乳球菌也含有多种质粒,大小为 2~130 kb。所有已知的乳酸菌质粒的详细信息都可以在质粒数据库中找到。一些乳酸菌特别是链球菌有很多转座子复杂的结构,意味着更高的遗传学可塑性。含有很长的相似重复片段的大质粒的出现为

收稿日期:2013-12-05

基金项目:上海理工大学科研启动基金(编号:A2500130104)。

作者简介:叶 巍(1981—),女,黑龙江大庆人,博士,讲师,主要从事生物工程研究。E-mail:beatificy@hotmail.com。

[16] Li G, Quiros C F. Sequence - related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2/3): 455 - 461.

[17] Han X Y, Wang L S, Liu Z A, et al. Characterization of sequence - related amplified polymorphism markers analysis of tree peony bud sports [J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 115(3): 261 - 267.

[18] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence - related amplified polymorphism markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(2): 328 - 334.

[19] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(2): 271 - 282.

[20] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(19): 2064 - 2068.

[21] 周劲松, 曹哲明, 杨国梁, 等. 罗氏沼虾缅甸引进种和浙江本地种及其杂交种的生长性能与 SRAP 分析 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 667 - 673.

[22] 傅洪拓, 乔 慧, 姚建华, 等. 基于 SRAP 分子标记的海南沼虾种群遗传多样性 [J]. *生物多样性*, 2010, 18(2): 145 - 149.

[23] 丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子

标记 [J]. *动物学报*, 2008, 54(3): 475 - 481.

[24] 程长洪, 张敏莹, 刘 凯, 等. 利用 SRAP 标记研究四个暗纹东方鲀群体的遗传多样性 [J]. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 858 - 865.

[25] 冉 玮, 张桂蓉, 王卫民, 等. 利用 SRAP 标记分析 3 个团头鲂群体的遗传多样性 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 601 - 606.

[26] Hu Z H, Lv Y P, Wang C H, et al. Analysis on 'Whole Red' of patterns Oujiang colour carp (*Cyprinus carpio* var. *Color*) by SRAP and SCAR markers [J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(4): 588 - 594.

[27] 徐汗福. 乌苏里拟鲶 (*Pseudobagrus ussuriensis*) 不同群体间的遗传多样性比较研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2011.

[28] 张志伟, 陈爱华, 姚国兴, 等. 我国沿海不同地理原种文蛤的 SRAP 分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(3): 429 - 434.

[29] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Springharbor Laboratory Press, 1989.

[30] 贾永义, 顾志敏, 叶金云, 等. 翘嘴红鲌 (♀) × 团头鲂 (♂) 杂种 F₁ 的 SRAP 标记分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(2): 198 - 203.

[31] 张 慧. 大麻哈鱼 SRAP 体系建立及其遗传多样性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.

[32] 张永明, 金 洪, 马万里, 等. 濒危植物绵刺 8 个种群遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *生态学报*, 2009, 29(5): 2686 - 2693.