

文章编号: 1000-0615(2004)03-0334-05

• 研究简报 •

3 个不同地理群体真鲷遗传变异的 RAPD 分析

江世贵¹, 杨慧荣^{1,2}, 苏天凤¹, 龚世园²

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

关键词: 真鲷; 胶州湾; 台湾海峡; 北部湾; 遗传变异; 随机扩增多态 DNA

中图分类号: S917 文献标识码: A

Genetic diversity of three geographical populations of *Pagrosomus major* revealed by RAPD analysis

JIANG Shi-gui¹, YANG Hui-rong^{1,2}, SU Tian-feng¹, GONG Shi-yuan²

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to assess the genetic variations among inter- and intra-population of three wild stocks (24 individuals) in Red Sea Bream from Jiaozhou Gulf (Qingdao), Taiwan Strait (Xiamen) and Beibu Gulf (Hainan). Under predetermined optimal reaction conditions, amplifications with 31 random primers selected from 60 gave 216 reproducible and stable fragments ranging from 200 to 2500bp. There were 176 polymorphic fragments. Based on the RAPD data, the genetic distances of intrapopulation for Jiaozhou Gulf, Taiwan Strait and Beibu Gulf wild stocks were 0.1350, 0.1056, and 0.1151, and similarities were 0.8650, 0.8944, and 0.8849. The genetic distances of interpopulation were 0.1645, 0.1413, and 0.1073. The maximum occurred between Jiaozhou Gulf and Beibu Gulf, the minimum did between Taiwan Strait and Beibu Gulf. This showed there were high genetic diversity among inter- and intrapopulation. With the methods of UPGMA and NJ in MEGA2.1 on the basis of genetic distances, the results showed the populations of Taiwan Strait and Beibu Gulf assembled one branch first, then did Jiaozhou Gulf. Both results were accordant.

Key words: *Pagrosomus major*; Jiaozhou Gulf; Taiwan Strait; Beibu Gulf; genetic diversity; RAPD

随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是建立在 PCR 技术基础上的检测 DNA 序列多态性和建立分子遗传标记的技术, Williams 等^[1]首次运用随机引物扩增寻找多态 DNA 片段作为分子遗传标记。Welsh 等^[2]也发现以寡核苷酸作为引物对基因组 DNA 进行扩增, 产物的图谱表现出高度的变异性。因其具有操作简单、能够快

速高效地提供许多个体或基因型许多位点的 DNA 序列多态性数据等优点, 在生物的遗传多样性、群体遗传学、分类学及农牧业的遗传育种等研究中得到了广泛的应用。

真鲷 (*Pagrosomus major*) 属鲈形目 (Perciformes) 鲈亚目 (Percoide) 鲷科 (Sparidae), 为近海底层鱼类, 是一种名贵的海洋经济鱼类, 也是我国海水鱼类养殖的重要对象, 在我国

收稿日期: 2002-12-02

资助项目: 国家科技基础工作专项; 广东省科技兴海重大项目 (A20009A01); 水科院人才基金项目

作者简介: 江世贵 (1964-), 男, 湖南澧县人, 研究员, 主要从事海洋生物技术研究。E-mail: jiangsg@21cn.com

的南海、东海和黄海均有分布。我国已经对真鲷的基础生物学和人工繁殖及养殖技术进行了大量研究并实现了规模化生产,但在分子水平上对真鲷种质资源状况研究尚较少,本文旨在通过RAPD技术对我国胶州湾、台湾海峡及北部湾这3个不同地理群体真鲷的遗传变异及分化进行研究,以期对真鲷的种质资源研究提供相关的遗传背景资料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用真鲷分别取自胶州湾(青岛,代号:qd群体)、台湾海峡(厦门,代号:xm群体)及北部湾(海南,代号:hn群体),各8尾,均为野生群体,在取样点取鱼背部肌肉冰冻运回实验室, -70℃保存。

1.2 随机引物及筛选

选用美国Operon公司试剂盒Kit A、Kit R与Kit S共60个10 bp的随机引物,在事先优化的反应条件下,筛选出清晰稳定的随机引物供扩增,其中无扩增产物、扩增带型模糊及不稳定的结果不作分析。

1.3 RAPD-PCR反应

基因组DNA的提取参考文献[3]的方法略加改进。PCR反应在Biometra PCR仪上进行。反应总体积25μL,其中10×Taq Buffer 2.5μL, Taq Polymerase 0.2μL (5U·μL⁻¹), dNTPs (2.5mmol·L⁻¹ each) 0.5μL, Mg²⁺ (25mmol·L⁻¹) 2.5μL, 引物(10μmol·L⁻¹) 2μL, 模板DNA 25ng, 无离子超纯水 15.3μL。扩增条件为:94℃预变性5min后,再进行

45个循环,每一循环包括:94℃45s, 36℃45s, 72℃90s; 最后72℃延伸10min。每次PCR反应均设不含模板DNA的空白对照。扩增产物经1.5%TBE琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,紫外灯光下检测、拍照。

1.4 数据分析

根据RAPD产物的电泳带型,进行群体内与群体间的比较分析。按公式 $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$ 计算个体间遗传相似性指数(n_{xy} 是个体 x 和 y 的共有带数, n_x 和 n_y 分别是个体 x 和 y 的扩增带数)。群体内的相似性指数(S)是群体内所有的两个体间相似指数的平均值。群体间的相似性指数(S_{ij})为群体 i 中的个体和群体 j 中的个体随机组合所得相似指数的平均值^[4,5]。用公式 $D = 1 - S$ 计算群体内及群体间的遗传距离,再用MEGA2.1软件的UPGMA程序和NJ程序进行聚类分析。

2 结果

2.1 RAPD扩增结果

在供筛选的60个随机引物中,有29个引物无扩增产物或因结果不稳定不作进一步分析。其余31个随机引物在3个群体的24个个体中扩增结果稳定、重复性佳,共产生216条扩增带(平均每个引物产生7条带),片段大小在200~2500bp之间,多态性带有176条,如果以每条DNA扩增带作一位点计,则多态位点占总位点的比例为81.48%。除OPA-17、OPR-4、OPR-16、OPS-6、OPS-19为单态引物外,其余均为多态引物,多态引物的比例为83.87%。表1为筛选出的引物编号、序列和扩增结果。

表1 筛选出的引物编号、序列和扩增结果

Tab. 1 The codes, sequences of primers elected and amplification results

引物 primers	序列(5' - 3') sequences(5' - 3')	扩增座位 amplified bands	引物 primers	序列(5' - 3') sequences(5' - 3')	扩增座位 amplified bands
OPA-1	GTTTCGCTCC	2-8	OPR-9	TGAGCCTCAC	4-5
OPA-3	CATCCCCCTG	3-7	OPR-12	GTCCCCTGGT	6-11
OPA-4	GGACTGGAGT	4-7	OPR-16	CTGCTTAGGG	3
OPA-5	TGCGCCCTTC	4-5	OPR-18	TGGTCGCAGA	3-6
OPA-8	GTCCACACGG	4-7	OPS-1	CATTTCGAGCC	5-10
OPA-11	GTAGACCCGT	5-6	OPS-2	GTCTCCGCAA	6-9
OPA-12	CCTTGACGCA	3-6	OPS-6	CACCTTCC	4
OPA-13	TTCCCCCGCT	2-5	OPS-10	GTGCAACGTG	3-4
OPA-14	TCCGCTCTGG	3-9	OPS-11	AATGCCCCAG	6-8
OPA-15	GGAGGGTGTT	5-10	OPS-13	GGTTGTACCC	3-4
OPA-17	AGGGAACGAG	5	OPS-14	CCCGCTACAC	4-10
OPA-20	GGACCCTTAC	4-6	OPS-16	GAGCGTCGAA	4-7
OPR-1	CCCGGCATAA	5-8	OPS-18	CCTAGTCGAG	6-11
OPR-4	CCGAACA CGG	4	OPS-19	CACAGCCGGA	4
OPR-5	CTCCATGGG	6-10	OPS-20	GTGTCCGGAG	5-11
OPR-6	TCGTTCCGCA	4-6			
总座位数 total bands		109	总座位数 total bands		107

2.2 RAPD 图谱

图版-1 为单态引物 OPA-17 的扩增图谱, 每个个体都有 7 条相同的带, 个体之间的带纹只存在亮弱的差别, 而不存在有和无的差异。图版-2 反应了多态引物 OPR-12 对部分真鲷个体扩增的 RAPD 带型存在着明显的差异, 有些个体体现出主亮带的缺失, 或各自特有的主亮带, 在个体间表现出明显的多态性。在图版-1 和图版-2 中, 编号 1~8 泳道是青岛群体, 9~16 泳道是厦门群体, 17~24 泳道是海南群体。M 代表 DNA Marker, 购自 TaKaRa 公司, 编号为 DL2000。

图版-3 为引物 OPA-15 在不同群体间有差异的扩增图谱, 编号 1~8 泳道是青岛群体, 9~17 泳道是厦门群体, 18~25 泳道是海南群体。从图中可以看出: 青岛群体有 5 条介于 600~1500bp 之间的片段, 厦门和海南群体的片段介于 250~1000bp 之间, 图谱表现出明显的群体特异性, 其中青岛群体与海南群体的电泳带纹差异较大, 青岛和厦门群体的差异其次, 厦门和海南群体的差异最小, 虽然在同一群体内存在着少数带纹的个体差异, 但群体间的差异较为显著。

2.3 遗传多样性与聚类分析

对 3 个地理群体真鲷进行群体内与群体间的遗传多样性分析。表 2 是将电泳图谱转化成“0-1”矩阵(详细数据

略)后在 RAPDDIST 或 RAPDPLOT 软件上换算成的 Nei 氏遗传距离^[6]。真鲷 3 群体内的遗传距离以青岛最大, 海南次之, 厦门最小, 遗传距离值分别为 0.1350、0.1151 和 0.1056; 群体间的遗传距离为青岛与海南最大, 青岛与厦门次之, 厦门与海南最小, 遗传距离值分别为 0.1645、0.1413 和 0.1073。可见群体内与群体间存在着较广泛的遗传变异, 并且在变异的程度上存在差异, 群体间的遗传距离高于群体内的遗传距离, 遗传距离与地理分布具有一致性。

将表 2 的结果输入计算机, 用 MEGA2.1 中的 UPGMA 程序和 NJ 程序进行聚类分析, 得到图 1 和图 2 的谱系关系图, 两者的结果较为一致。厦门与海南群体的遗传距离最近, 首先聚在一起, 其次是青岛群体。

3 讨论

Perez-Enriquez 和 Taniguchi^[7] 曾利用微卫星 DNA 标记技术研究了日本与太平洋西南部 8 个不同海域真鲷群体的遗传结构, 认为中国至日本沿岸、澳大利亚与新西兰的真鲷分别属于 3 个不同的种群(population), 中国至日本沿岸真鲷又可分为 3 个差异较大的亚种群(subpopulation), 其中中国东海(浙江海区)与南海(广东海区)的真鲷分别属于不同的亚种群, 而中国东海和黄海与日本沿海的真鲷则属同一亚种群。

表 2 3 个不同地理群体真鲷群体内、群体间的遗传相似系数以及群体间的遗传距离

Tab. 2 Inter- and intra-population genetic similarities and interpopulation genetic distances of three geographical populations of *P. major*

遗传相似系数和遗传距离 genetic similarities and distances	qd 群体 Qingdao population	xm 群体 Xiamen population	hn 群体 Hainan population
qd 群体 Qingdao population	0.8650	0.8587	0.8355
xm 群体 Xiamen population	0.1413	0.8944	0.8927
hn 群体 Hainan population	0.1645	0.1073	0.8849

注: 数字矩阵中对角线为群体内的相似系数, 其右上方为群体间的遗传相似系数, 左下方为群体间的遗传距离

Notes: The numbers in diagonal of matrix indicate genetic similarities of intrapopulation. The up-right and down-left ones mean genetic similarities and distances of interpopulation respectively.

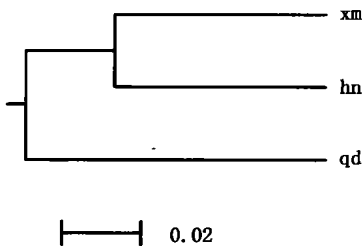


图 1 用类平均聚类法构建不同群体真鲷的谱系关系图
Fig.1 UPGMA dendrogram showing the relationships among three populations of *P. major*

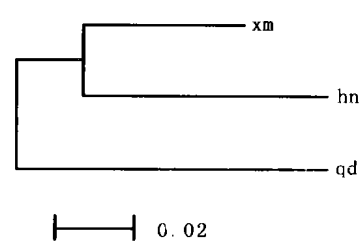


图 2 用邻接法构建不同群体真鲷的谱系关系图
Fig.2 NJ dendrogram showing the relationships among three populations of *P. major*

王伟继等^[8]运用同工酶技术研究了真鲷野生群体与养殖群体的遗传变异, 研究表明真鲷的养殖与野生群体都具有较高的遗传变异, 但瓶颈效应和遗传漂变导致了养殖群体遗传多样性的降低。王志勇等^[9]利用 AFLP 技术研究中国沿海真鲷群体的遗传变异和趋势, 结果为厦门海区与北部湾海区的真鲷差异较小, 黄海真鲷与前两个群体差异较大, 本文用 RAPD 方法研究的结果与之一致。

用于试验的 3 个采样区分别是胶州湾(青岛)、台湾海峡(厦门)和北部湾(海南), 且均为野生群体。从研究结果来看, 同一群体的个体间都存在着较大遗传变异, 少数个体的 RAPD 图谱显示出主要带型的缺失或各自特有的主亮带(图版-2), 这一现象在 24×24 矩阵的遗传距离指数(详细列表略)中得到了映证。胶州湾与北部湾群体的遗传差异较大, 遗传距离是 0.1645。从生殖习性来看, 胶州湾真鲷属春季生殖, 而北部湾真鲷属秋冬季生殖类型; 从地理位置和气候来看, 胶州湾与北部湾地处遥远, 南北气候相差较大, 胶州湾属温带海洋性气候, 北部湾属热带海洋性气候, 它们在地理条件、生态环境和繁殖习性上的较大差异直接导致了地理隔离和生殖隔离, 所以在不同水域形成遗传性能上互有差异的孟德尔繁育群体, 两者明显属于相互独立的不同地方种群(或称为亚种群), 这与 Perez-Enriquez 和 Taniguchi 的报道相一致。台湾海峡与胶州湾的遗传距离是 0.1413, 与北部湾的遗传距离是 0.1073。台湾海峡与北部湾真鲷都属于秋冬季生殖类型, 台湾海峡的亚热带海洋性气候与北部湾的热带海洋性气候较为接近, 且两者的采样点均位于南海海区, 在地理位置与生态习性上相距较近, 群体间的遗传距离与其地理分布具有一致性。

试验所使用的 60 个随机引物中, 仅引物 OPA-15 在 3 个不同地理群体真鲷间扩增出了体现群体差异的图谱(图版-3), 图谱直观地显示出: 青岛群体与海南群体的电泳带纹差异较大, 青岛和厦门群体的差异其次, 厦门和海南群体的差异最小, 引物 OPA-15 所扩增出图谱的差异与本研究计算得到的群体间的遗传距离值相一致。

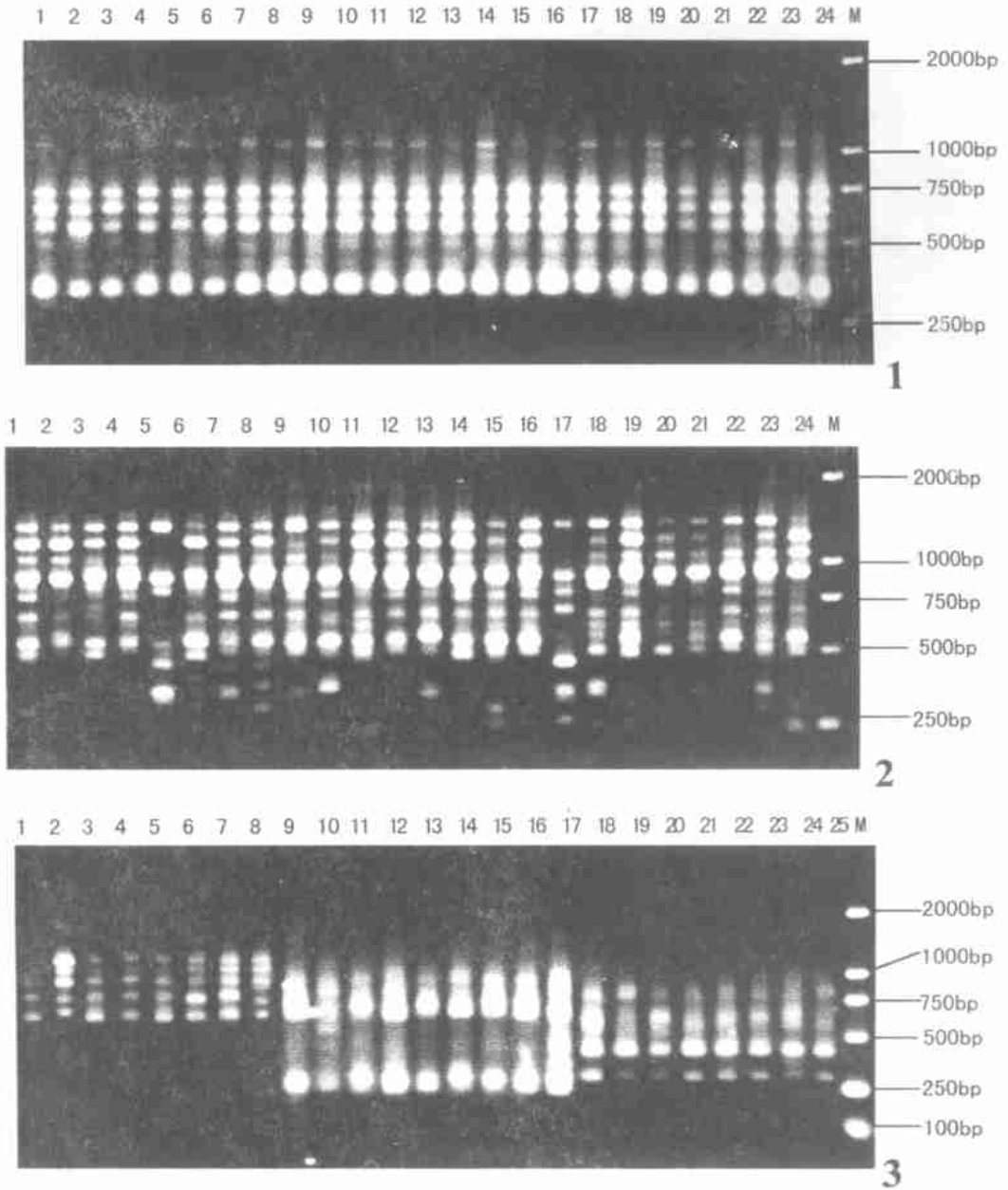
RAPD 技术已用于研究大银鱼、太湖新银鱼、中华鲟等不同地理群体的遗传变异^[10,11], 群体间的遗传距离值位于 0.035~0.190 之间, 相比之下, 本研究中真鲷的遗传距离值较高, 相互之间的遗传差异较大, 说明 3 个不同海区的真鲷是相互独立的地理群体。由此可以推测, 在自然情况下, 这 3 个海区的真鲷在繁殖与育肥索饵时的洄游, 一般不会导致种群间的种质交流问题; 如果出现种质混杂现象, 应是人为因素导致。

不同真鲷群体间的遗传距离反映了其遗传组成的分化程度, 而一个真鲷群体内的遗传距离则反映了该群体的遗传多样性程度。研究结果表明, 胶州湾群体内的遗传距离最大, 北部湾次之, 台湾海峡最小, 分别是 0.1413、0.1151 和 0.1056。台湾海峡的真鲷群体遗传多样性较其它两个群体

低, 表现为群体内的遗传距离降低。分析其原因可能是: 胶州湾与北部湾地处我国的北部与最南端, 环境相对封闭, 受人类活动及其它方式迁入(或迁出)个体的影响较少; 而台湾海峡则位于胶州湾和北部湾之间, 苗种的运输及交流较为频繁, 加之人工育苗生产与自然逃逸、增殖放流等的因素, 使其种群遗传结构受到影响。因此, 人类活动对种群遗传多样性的影响是一个值得深入探讨的问题。

参考文献:

- [1] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [2] Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic[J]. Nucl Acids Res, 1991, 19: 303-306.
- [3] Jin D Y, Li M F. Molecular cloning: a laboratory manual(2nd ed) [M]. Beijing: Science Publishing Company, 1996. 464-469. [金冬雁, 黎孟枫(译). 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 464-469.]
- [4] Bardacki F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification [J]. Heredity, 1994, 73: 117-123.
- [5] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478-484.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(5): 5269-5273.
- [7] Perez-Enriquez R, Taniguchi N. Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population of Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA markers[J]. Fish Sci, 1999, 65(1): 23-30.
- [8] Wang W J, Kong J, Zhuang Z M, *et al.* Isozyme variation of the wild and hatchery populations of red sea bream [J]. Chinese Biodiversity, 2000, 8(4): 391-396. [王伟继, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶遗传差异[J]. 生物多样性, 2000, 8(4): 391-396.]
- [9] Wang Z Y, Wang Y L, Lin L M, *et al.* Genetic variation and divergence of *Pagrus major* from China seas using AFLP fingerprinting[J]. J Fish China, 2001, 25(4): 289-294. [王志勇, 王艺磊, 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势[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 289-294.]
- [10] Xia D Q, Cao Y, Wu T T, *et al.* Genetic structures of population of *Protosalanx chinensis*, *Neosalanx taihuensis* and *Neosalanx oligalontis* in Lake Taihu [J]. J Fish China, 1999, 23(3): 254-260. [夏德全, 曹莹, 吴婷婷, 等. 太湖中大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼群体的遗传结构[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 254-260.]
- [11] Zhang X Y, Zhang D C, Yang D S, *et al.* Analysis on genetic diversity of *Hypophthalmichthys molitrix* in Changjiang River [J]. J Fish China, 1999, 23(suppl): 7-14. [张锡元, 张德春, 杨代淑, 等. 长江鲢遗传多样性的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 水产学报, 1999, 23(增刊): 7-14.]



图版 Plate

1. 单态引物 OPA-17 对 3 个不同地理群体真鲷基因组的 RAPD-PCR 图谱; 2. 态引物 OPR-12 对 3 个不同地理群体真鲷基因组的 RAPD-PCR 图谱; 3. 多态引物 OPA-15 对 3 个不同地理群体真鲷基因组的 RAPD-PCR 图谱
 1 RAPD-PCR patterns of three geographical populations of *P. major* using primer OPA-17; 2 RAPD-PCR patterns of three geographical populations of *P. major* using primer OPR-12; 3 RAPD-PCR patterns of three geographical populations of *P. major* using primer OPA-15