

文章编号: 1000-0615(2008)03-0492-05

• 研究简报 •

钝吻黄盖鲽野生群体遗传多样性分析

张 岩^{1,2}, 肖永双^{1,2}, 高天翔², 陈四清¹, 于 函^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;
3. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

关键词: 钝吻黄盖鲽; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S 917

文献标识码: A

钝吻黄盖鲽(*Pleuronectes yokohamae*)隶属于鲽形目、鲽科、黄盖鲽属,为冷温性底层鱼类,是黄渤海常见的比目鱼,产量在黄渤海鲽类中仅次于高眼鲽,是我国海洋渔业重要的经济鱼类。黄盖鲽分布于北太平洋西部近海,东海北部到黄渤海,朝鲜半岛、俄罗斯鞑靼海峡及日本北海道南部都有分布,主要栖息于沿岸的泥沙底或岩礁底海域,属于肉食性底栖鱼类,我国产于黄海和渤海,辽宁省长海县、山东省石岛等地产量较多,渔期多在 5 月份和 8 月份。黄盖鲽肉质细嫩,鲜食为主,深受国内外消费者欢迎。我国远洋渔业船队在阿拉斯加捕获的黄盖鲽,通过在海上去头冷冻加工后保持鲜度,运回国内市场颇受消费者欢迎。同时也是出口品种,主要输往日本和韩国,出口口岸有山东、辽宁、江苏等沿海口岸。当前对钝吻黄盖鲽的研究仅仅停留在形态分布、地理分布、年龄、生长和繁殖等生物学方面,而对钝吻黄盖鲽种群遗传多样性的研究在国内尚未见有报道。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术是建立在 PCR 基础上的简便的 DNA 分子标记技术,具有灵活、快速、特异性强和容易检测等优点,既有大量的随机引物可供筛选,又不受种属的限制,该技术自诞生以来,已被广泛的应用于生物多样性、群体遗传、种属分类、亲缘关系分析和系统研究。当前 DNA 水平上的钝吻黄盖鲽资源分析评估工作还未见报道,无法确认钝吻黄盖鲽资源现状,因此采用分子标

记手段进一步分析钝吻黄盖鲽种质资源极其必要。本研究应用 RAPD 技术在分子水平上对野生钝吻黄盖鲽的遗传多样性进行分析,为进一步研究钝吻黄盖鲽野生种群的遗传结构提供基础数据,同时也为进一步保护、合理的利用该资源以及选择育种方面提供遗传学上的依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

钝吻黄盖鲽样本于 2005 年 11 月捕自位于渤海的蓬莱附近海域,所取 40 尾样本的体长为 173~280 mm,体重为 159~356 g,从中随机选取 30 尾进行 RAPD 分析。

1.2 方法

模板 DNA 的制备 基因组的提取采用了标准的酚氯仿方法并略有改进,获得的基因组 DNA 沉淀溶于适量灭菌的双蒸水中,通过琼脂糖凝胶电泳(含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭)检测来鉴定所提 DNA 的质量,用分光光度仪测定 DNA 的浓度。

引物筛选和 RAPD 反应条件 对购自上海生物工程技术有限公司的 48 条随机引物进行了筛选,选择了 20 条重复性好的引物用于 RAPD 分析。RAPD 反应的总体积为 $20 \mu\text{L}$,包括:模板 DNA 16 ng ,引物 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$, $10 \times \text{Ta}p$ 酶反应缓冲液(成分: $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl, $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $1.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA, 0.01% gelatin, pH 8.4)

收稿日期: 2007-01-19

资助项目: 国家科技基础条件平台项目(2004DKA30470);农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室开放课题(实开 2005-07)

作者简介: 张 岩(1963-),女,山东青岛人,副研究员,从事种质资源及海水养殖标准化研究。E-mail: zhangyan@ysfri.ac.cn

2.5 μL , MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 μL , Taq 酶 ($2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 灭菌 ddH_2O 补足体积。PCR 反应在 PCR system 9600 扩增仪上进行, 反应程序为: 94°C 预变性 7 min 后进行 40 个循环, 每个循环包括 94°C 1 min、 37°C 1 min、 72°C 2 min, 最后于 72°C 延伸 10 min。反应结束后 15°C 保存。

电泳检验 RAPD 产物用含有溴化乙锭的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统观察记录。

数据分析 根据观察结果, 有扩增条带且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建原始数据表征矩阵, 并据此统计位点总数和多态位点比例, 用 Popgene ver. 1. 31 和 RAPDistance ver. 1. 04 分析和计算群体的遗传多样性参数。

多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$

Shannon 多样性指数 $H = -\sum P_i \log_2 P_i$ (P_i 为第 i 条扩增条带存在的频率)

Nei 基因多样性指数 $H_e = 1 - \sum P_i^2$, (P_i 为单个位点上的等位基因的频率)

任意两个个体间遗传相似性和遗传距离用下列公式计算:

$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $P = 1 - F$, 式中, F 为两个个体间遗传相似度; P 为两个个体间遗传距

离; N_x 和 N_y 分别为 x 和 y 个体共同拥有的 RAPD 标记总数; N_{xy} 是 x 和 y 两个个体共享 RAPD 标记数。

2 结果

从 48 个 10 核苷酸的随机引物中筛选了 20 个对蓬萊钝吻黄盖鲈的遗传多样性进行分析, 表 1 给出了 20 个随机引物的序列及扩增情况。每个引物扩增出 4~13 条清晰且重复性强的谱带, 共计 148 条, 平均每个引物扩增出 7.4 条, 其中 94 条谱带表现为多态, 多态比例为 63.51%。20 个引物均为多态性引物, 对全部扩增产物进行统计, 任何两个个体所拥有的遗传标记不完全相同, 即任意两个个体间均具有遗传差异。图 1 列出了 S362 和 S369 引物在 30 个个体的扩增图谱。由 20 个随机引物所检测的钝吻黄盖鲈里产生群体内表型频率计算的 Shannon 多样性指数为 0.2824; Nei 基因多样性指数为 0.1991; 群体的平均杂合度为 0.2087。

3 讨论

遗传多样性体现了物种种群之内和种群之间的遗传结构的变异, 各个种群由于突变、迁移、自然选择或其他原因, 往往在遗传结构上存在差

表 1 选取的 20 个引物的扩增结果

Tab. 1 Amplification results of the 20 arbitrary primers used in the study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequences of primers	位点总数 total no. of RAPD loci	多态位点数 total no. of polymorphic loci	多态位点百分率(%) percentage of polymorphic loci
S81	CTACGGAGGA	9	9	100
S86	GTGCCTAACC	9	6	66.7
S89	CTGACGTCAC	4	2	50
S92	CAGCTCACGT	10	6	60
S93	CTCTCCGCCA	4	3	75
S95	ACTGGGACTC	7	4	57.1
S99	GTCAGGGCAA	4	2	50
S100	TCTCCCTCAG	7	6	85.7
S361	CATTCGAGCC	8	7	87.5
S362	GTCTCCGCAA	6	3	50
S363	CCAGCTTAGG	9	3	33.3
S364	CCGCCCAAAC	9	5	55.6
S366	CACCTTTCCC	8	1	12.5
S369	CCCTACCGAC	11	9	81.8
S370	GTGCAACGTG	7	3	48.9
S371	AATGCCCCAG	10	9	90
S372	TGGCCCTCAC	5	1	20
S373	GGTTGTACCC	8	4	50
S376	GAGCGTCGAA	5	2	40
S378	CCTAGTCGAG	5	1	20
总数 total		148	94	63.51

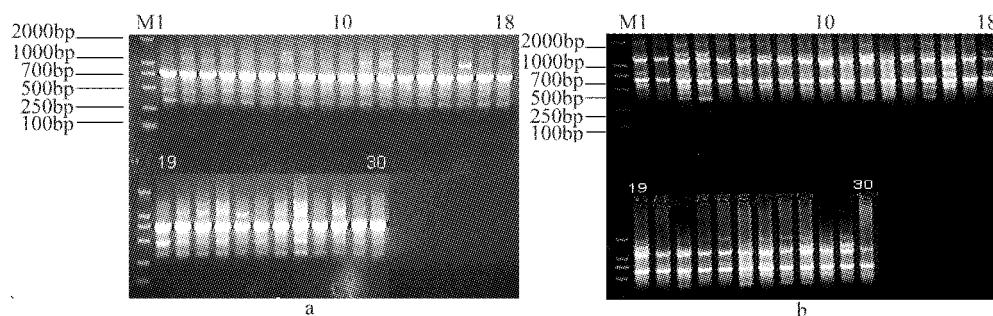


图1 引物 S362 和 S369 的扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Amplification of genomic DNA of *Pleuronectes yokohamae* with primer S362 and S369

a. 引物 S362; b. 引物 S369; M. Marker (DL 2000)

a. primer S362; b. primer S369; M. Marker (DL 2000)

异。遗传多样性,从理论上说是生物适应环境与进化的基础,就一个物种而言,种内遗传多样性愈丰富,该物种对环境变化的适应能力愈大其进化潜力也愈大。反之,遗传多样性的降低可导致其适应能力、生存能力降低,物种退化,极端情况下甚至威胁物种生存。对物种的遗传多样性及种群结构进行研究,是为了最大限度的维持种内的遗传多样性水平,维持物种和种群的自然繁殖能力、进化潜力,确保种质资源的可持续利用。

3.1 样本的代表性及引物数量

RAPD 标记由一条随机核苷酸引物扩增获得,因此扩增过程比较敏感,可能存在重复性问题。影响重复性的主要因素为基因组的大小、模板 DNA 长度和含量。在本实验中,钝吻黄盖鲽的基因组远远高于 1.5 Mb 的临界值,且模板 DNA 均在 100~150 kb 之间,又采用了 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的最适模板含量,故实验结果具有较高的重复性。

一般说来,样本数越大,其所具有的性质也就越接近于总体,也就越能反应总体的真实情况。谢浩等^[1]根据 Tajima 的 DNA 序列抽样分布理论,认为在 DNA 水平上估计种群变异时,样本量 $n \geq 10$ 时,抽样样本的方差便不会太大。因此作者认为 $n = 10$,甚至 $n = 5$ 就是比较合适的样本容量。国外的一些报道也基本上证实这一结论。Hirak 等^[2]对 4 个种印度鲤研究时样本容量仅为 6 个,Smitta 等^[3]比较新西兰贻贝 (*Perna canaliculus*) 养殖群体与野生种群遗传变异时样本在 20 个左右。由此可见,本试验 30 个个体的样本量,应该能够很好的反应种群的种质资源

状况。

RAPD 反应需要一定的引物数才能获得足够的基因用于结果分析,相对于试验对象基因组来说,一般所用引物越多其扩增 DNA 带愈多,其基因组覆盖面愈大,揭示的信息愈多,鉴定或标记的结果会更准确。

目前,在应用 RAPD 技术的文献中,对需要的引物数量仍然没有一个明确的规定,Demeke 等^[4]在研究芸苔属植物时认为,要充分反映其亲缘关系,至少需要 10 种引物约 100 个 RAPD 标记。陈新露等^[5]也认为:至少 13 个引物进行 PCR 反应才能使 RAPD 分析结果更加客观。本研究中我们从 48 个引物中筛选的 20 个引物均为多态引物,因此实验结果应该具有较高的可靠性。

3.2 与同工酶分析结果的比较

目前对于钝吻黄盖鲽群体的遗传多样性研究较少,还没有用 RAPD 进行分析的报道,对于鱼类和其他鲆鲽类遗传多样性的研究,同工酶方面的报道较多,Smith 等^[6]报道了 106 种海水鱼类的杂合度平均值为 0.055 ± 0.036 ,认为鲆形目具有较高的杂合度,Yoshihisa 和 Yasunari^[7]采用同工酶电泳技术对 8 个目 41 种鱼类的分析表明,鱼类的杂合度平均值为 0.059 ± 0.007 ,也认为鲆形目具有较高的杂合度,对日本仙台近海钝吻黄盖鲽群体的分析表明,其多态位点比率为 21.7% (P 95),日本曾报道过用同工酶淀粉胶电泳技术,对日本沿海的钝吻黄盖鲽野生种群进行了遗传多样性分析,其多态位点比率为 0.250~

0.500(P 99)^[8],笔者也曾经采用同工酶淀粉胶电泳技术,对蓬莱海域钝吻黄盖鲮野生群体的遗传多样性进行了分析,共分析了 8 种组织的 5 种同工酶,以 0.99 为判断标准,其多态位点比率为 23.53%(P 99),以 0.95 为判断标准,其多态位点比率为 5.88%^[9]。与上述用同工酶获得的分析结果比较,本研究所涉及的钝吻黄盖鲮野生群体都具有较高的多态位点比例和平均遗传杂合度。

通常 RAPD 分析所显示的多态性要比同工酶高很多,因为大部分的 RAPD 变异是由于非编码区和重复 DNA,遍布整个基因组^[10],因此本试验的结果要比同工酶分析获得的遗传变异参数值高,这与大多数学者的结果类似,也充分反映了 RAPD 技术在遗传变异分析中的高效性。

3.3 钝吻黄盖鲮野生群体种质资源现状分析

同一物种某个群体内的遗传距离反映了该群体的遗传多样性,数值越大,该群体遗传多样性丰富程度就越高,而遗传多样性是生物适应各种环境的基础,本研究所分析的钝吻黄盖鲮任意两个体间的遗传距离在 0.0148~0.1963 之间,该群体 30 个受试个体的遗传距离平均值为 0.129,说明钝吻黄盖鲮野生群体内的遗传变异比较丰富。同时通过横向比较 RAPD 检测到的其他鱼类的多态位点比率发现,钝吻黄盖鲮比笛鲷(*Lutjanus* sp.) (92.1~68.47)^[11]、小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*) (91.03)^[12]、梭鱼(*Liza haematocheila*) (85.71)^[13]、蜂巢石斑鱼(*Epinephelus merra*) (65.58) 低^[14],与真鲷(*Pagrus major*) (62.6) 相当^[15],比条纹鲈(*Moronesax atilis*) (49.06)^[16]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*) (48.48)^[17]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) (18.9 和 16.7) 高^[18],说明我国蓬莱钝吻黄盖鲮遗传多样性处于中等水平。

近年来,通过渔业资源调查发现钝吻黄盖鲮的产量出现了明显的下降趋势。许多学者对海洋鱼虾类如中国对虾、虹鳟、牙鲆、大黄鱼等的遗传多样性的研究表明,由于过度捕捞、自然条件变化等因素的影响,野生种群的遗传结构发生变化^[18-20]。由于没有以前的钝吻黄盖鲮遗传多样性分析资料,因此还不能评判过度捕捞和自然环境的破坏等因素对钝吻黄盖鲮野生群体遗传多样性的影响程度,但是目前中国钝吻黄盖鲮种质资源日趋贫乏,钝吻黄盖鲮的野生群体的遗传多

样性也必然承受着来自过度捕捞和水质污染等方面的压力,从资源利用和保护上来考虑,采取适当的措施保护钝吻黄盖鲮野生群体已经刻不容缓了,准确的遗传监测对钝吻黄盖鲮品种改良、优良性状基因的利用等都具有重要意义。对于每一个品种而言,必须建立有足够分辨率的多态位点基因图谱,才能对影响重要经济性状的基因进行定位、鉴定和利用。目前 RAPD 标记已建立了斑马鱼(*Danio rerio*)、日本青鲮(*Mugil cephalus*)和鲤[*Cyprinus (cyprinus) carpio haematopterus*和*Cyprinus(cyprinus) pellegrini pellegrini*]的基因图谱。通过本试验的结果,结合多种分子标记技术对我国钝吻黄盖鲮野生群体资源的遗传多样性进行检测,以整体把握其遗传多样性水平,只有这样才能及时准确地了解钝吻黄盖鲮在中国的生存、定居和繁衍等,为合理保护钝吻黄盖鲮的种质资源提供依据。

参考文献:

- [1] 谢 浩,陆仁后,项超美,等. 利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究[J]. 水生生物学报, 1999,23(2):120-126.
- [2] Hirak K B, Ashoktaru B, Bharat M Y, et al. Genetic variation between four species of indianmjoor carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay[J]. Aquaculture, 2003, 217:115-123.
- [3] Smita A, Bastiaan S, Jonathan P A, et al. Comparison of genetic diversity between cultured and wild populations, and a test for genetic introgression in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin 1791)[J]. Aquaculture, 2003, 219:193-220.
- [4] Demeke T, Adams R P, Chibbar R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in *Braasica*[J]. Theor Appl Genet, 1992,84:990-994
- [5] 陈新露,赵祥云. 应用 RAPD 技术评价丁香品种间遗传关系[J]. 园艺学报, 1995,22(2):171-175.
- [6] Smith P J, Fujio Y. Genetic variation in marine teleosts: High variability in habitat specialists and low variability in habitat generalists[J]. Marine Biology, 1982, 69:7-20.
- [7] Yoshihisa F, Yasunari K. Genetic variation in fish population[J]. Bulletin of the Japanese Society of

- Scientific Fisheries, 1979, 45(9): 1169–1178.
- [8] Japan Fisheries Resource Conservation Association. Population differentiation of marine organism by isozyme analysis [R]. Report on the Genetic Assessment Project. Japan Fisheries Resource Conservation Association, Tokyo, 1989, 28–209.
- [9] 张岩, 高天翔, 刘曼红, 等. 钝吻黄盖鲷同工酶组织特异性及群体遗传结构的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学学版), 2007, 37(2): 235–242.
- [10] Callejas C, Ochando M D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique [J]. J Fish Bio, 1998, 53: 208–215.
- [11] 刘丽, 刘楚吾. 5种笛鲷属鱼类的遗传多样性及分子标记[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(3): 349–355.
- [12] 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 2003, 11(3): 197–203.
- [13] 权洁霞, 戴继勋, 沈颂东. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 82–87.
- [14] 郑莲, 刘楚吾. 蜂巢石斑鱼随机扩增多态性 DNA 的初步研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(4): 15–18.
- [15] 孟宪红, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 248–252.
- [16] Bielawski J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass [J]. Heredity, 1997, 78: 32–40.
- [17] 李卢, 薛良义, 韦家永. 花鲈养殖群体随机扩增多态性分析[J]. 水利渔业, 2006, 26(2): 13–15.
- [18] 王军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2001, 23(3): 87–91.
- [19] 石拓, 孔杰, 刘萍, 等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 自然科学进展, 2001, 11(4): 360–364.
- [20] Ryman N, Stahl G. Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*) [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1980, 37: 82–87.

Analysis of genetic diversity of natural population in *Pleuronectes yokohamae*

ZHANG Yan^{1,2}, XIAO Yong-shuang^{1,2}, GAO Tian-xiang², CHEN Si-qing¹, YU Han^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to detect the DNA polymorphism in 30 individuals of natural population of *Pleuronectes yokohamae*. 20 arbitrary primers selected from 48 primers were used and 148 clear, repeatable RAPD bands were generated in which 94 bands were polymorphic. All the primers are polymorphic primers. Each primer used for the detection could produce 4–13 molecular markers with the average of 7.4. DNA fingerprints vary in length from 200–2 000 bp. The percentage of polymorphic fragments was 63.51%, while the index of Shannon diversity was 0.2824 and the index of gene diversity was 0.1991. Every individual had genetic difference and the genetic distance between individuals was from 0.0148 to 0.1963. Comparing the genetic diversity of *Pleuronectes yokohamae* with that of other fishes, the experiment revealed that the genetic diversity of *Pleuronectes yokohamae* was at middle level. This result will give data for the future study of genetic diversity in *Pleuronectes yokohamae*.

Key words: *Pleuronectes yokohamae*; genetic diversity; RAPD