

梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析*

权洁霞 戴继勋 沈颂东

(青岛海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

邓景耀 庄志猛

(中国水产科学院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 利用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术,对黄河口海域梭鱼人工养殖群体与自然群体的遗传多样性进行了分析比较,以期由分子水平了解梭鱼的种群遗传多样性背景及人为干涉因素对梭鱼种群遗传多样性造成的影响. 选用 OPC 组 20 个 10 碱基对(bp)的随机引物,对采自河北省黄骅市的 24 尾野生梭鱼和 15 尾人工养殖梭鱼进行了分析. 选出 11 个扩增效果稳定的引物用于群体分析,扩增结果具有较好的可重复性. 11 个引物共检出 112 个位点,其中养殖群体中有 94 个表现多态,多态比例为 83.93%;自然群体在 96 个位点上表现多态,多态比例为 85.71%. 经计算,养殖群体的遗传多样性指数为 0.212 4,自然群体的遗传多样性指数为 0.227 1;梭鱼两群体间的相似系数为 92.82%,遗传距离为 0.071 8. 研究表明,目前黄河口海域梭鱼群体的遗传多样性比较丰富,人工养殖过程对其未造成明显的影响,估计这与人工养殖过程中人为干涉因素少(如育苗历史短、亲鱼来源于自然群体、无定向选择和近亲繁殖等)有关. 这一结果表明,梭鱼的人工养殖业在黄河口海域有很好的发展前景.

关键词 梭鱼 随机扩增多态 DNA(RAPD) 遗传多样性

中图分类号: Q78

1 引言

梭鱼(*Liza haematocheila* 或 *L. so-iuy* 或 *Mugil so-iuy*,)是温热带浅海区重要的经济鱼类之一,主要分布于朝鲜、日本、中国沿海及河口咸淡水交界处,在咸水、咸淡水及淡水中均

本文于 1999-05-19 收到,修改稿于 2000-05-10 收到.

* 国家自然科学基金重点资助项目(编号:39630260).

第一作者简介:权洁霞,女,28岁,博士,从事海洋动植物生物工程研究.

能生长,具有很大的养殖潜力,但长期以来梭鱼增养殖业的发展在我国一直处于较原始较粗放的阶段,许多人工繁殖和人工放流工作完全是在没有考虑其遗传背景的情况下进行的.大量的研究表明,遗传多样性,作为一种非常有效的遗传标记,在种质鉴定、遗传多样性维持、混合渔业分析、标记辅助选择育种、人工增殖放流的方案设计和效果评估等领域有广泛的应用^[1],而对梭鱼的类似研究未见报道.因此,很有必要对梭鱼的遗传多样性进行研究,以便为梭鱼的遗传改良及合理有效的开发利用奠定基础,从而推动梭鱼增殖业的迅速发展.

随机扩增多态 DNA 技术(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)具有灵敏、方便、多态性强等优点,被广泛用于多种动植物的系统进化、种质鉴定、群体遗传变异分析、目标性状基因的分子标记以及遗传图谱的快速构建等领域,尤其适用于近缘种及种下水平的群体遗传研究^[2].本研究利用随机扩增多态 DNA 技术由 DNA 水平对我国黄河口海域的梭鱼群体(包括自然群体和人工养殖群体)的遗传多样性进行了研究,以期由分子水平了解梭鱼的遗传多样性背景和人为干涉因素对其造成的影响,从而为梭鱼生物资源的种质保存、遗传改良及进一步的开发利用提供可靠而丰富的理论依据.

2 材料和方法

2.1 样本采集

样本采于 1998 年 5 月.自然群体的样本采自河北省黄骅市附近海域($n = 24$),人工养殖群体的样本采自河北省黄骅市南排河镇养殖池塘($n = 15$).取新鲜肌肉组织迅速冷冻,低温返回实验室在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于基因组 DNA 的提取.

2.2 DNA 提取

取适量(约 0.1 g)肌肉组织于 Eppendorf 管内,立即加入 STE($100\text{ mmol}/\text{dm}^3\text{ NaCl}$, $10\text{ mmol}/\text{dm}^3\text{ Tris HCl}$, $100\text{ mmol}/\text{dm}^3\text{ EDTA}$, pH 8.0)液 600 mm^3 ,用眼科剪剪碎组织,加入 1/10 体积 SDS(10%)和足量的蛋白酶 K($10\text{ mg}/\text{cm}^3$)于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行消化;待消化完全后,先后通过等体积(750 mm^3)饱和酚、酚-氯仿(1:1)和氯仿-异戊醇(24:1)进行蛋白抽提;然后用等体积(750 mm^3)异丙醇沉淀 DNA,并用 70%冷乙醇洗涤沉淀,室温自然干燥 DNA,溶解于 TE ($10\text{ mmol}/\text{dm}^3\text{ Tris HCl}$, $1\text{ mmol}/\text{dm}^3\text{ EDTA}$, pH 8.0)液,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

2.3 引物筛选

2.3.1 PCR 扩增

每个群体取两个样品,每个样品设 3 个模板浓度,用 OPC 组 20 个随机引物进行 PCR 扩增.每个 PCR 反应总体积为 25 mm^3 ,其中含 Taq DNA 聚合酶 1 单位、 $d\text{NTP}100\text{ }\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $\text{MgCl}_2\text{ }2\text{ mmol}/\text{dm}^3$ 和 10 乘反应缓冲液 2.5 mm^3 .反应在 PE2400 扩增仪上经 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进行 40 个循环,每个循环包括 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min,最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照.

2.3.2 电泳检测

扩增产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,在紫外光下观察拍照.

2.3.3 引物筛选

以扩增条带的强度、个体内一致性、个体间的多态性等为标准对 20 个引物进行筛选.一般选择扩增带谱清晰、个体内一致性强、具有比较丰富的多态性的引物进行下一步群体分析.

2.4 群体分析

用选择的引物对两群体的所有样本进行 PCR 扩增,其反应条件、扩增参数及检测方法同上,其中每个样本设 2 个模板浓度,以判除由于模板用量不同造成的假阳性伪带。

2.5 数据统计和分析

(1) 将每个条带看作一个位点,统计位点总数、多态位点数及每个多态位点在每个群体的分布频率。

(2) 计算多态位点比例 P (P 等于某群体的多态位点数除以位点总数乘 100%)。

(3) 参考 Wachira 等^[3]的公式计算每个群体的遗传多样性指数 H , $H = -\sum x_i \ln x_i / n$, 其中 x_i 为某一位点在某一群体中出现的频率, n 为此群体检测到的位点总数。

(4) 计算两个群体间的遗传相似系数 F 和遗传距离 D ^[4]: $F = 2x_{1,2} / (x_1 + x_2)$, $D = 1 - F$, $x_{1,2}$ 为 1, 2 群体共享位点数, x_1 为 1 群体的位点总数, x_2 为 2 群体的位点总数。

3 结果

3.1 引物筛选结果

对 OPC 组 20 个引物的筛选表明,除了 OPC-03, OPC-04, OPC-06, OPC-07, OPC-12, OPC-15 和 OPC-16 无扩增带外,其余 14 个(70%)引物产生了比较清晰的扩增谱带(表 1),且扩增结果具有较好的可重复性,其中 OPC-10 和 OPC-18 两引物的扩增产物在个体内表现很高的不一致性而未选做群体分析,OPC-15 的产物条带少且无多态,也未选做进一步的群体分析。

表 1 梭鱼基因组 DNA 对 20 个引物的筛选结果

引物	序列(5'-3')	选择结果	多态性	扩增带数
OPC-01	TTCGAGCCAG	选	有	12
OPC-02	GTGAGGCGTC	选	有	11
OPC-03	GGGGGTCTTT	不选*	/	/
OPC-04	CCGCATCTAC	不选*	/	/
OPC-05	GATGACCGCC	选	有	10
OPC-06	GAACGGACTION	不选*	/	/
OPC-07	GTCCCGACGA	不选*	/	/
OPC-08	TGGACCGGTG	选	有	12
OPC-09	CTCACCGTCC	选	有	10
OPC-10	TGTCTGGGTG	不选*	有	7
OPC-11	AAAGCTGCGG	选	有	10
OPC-12	TGTCATCCCC	不选*	/	/
OPC-13	AAGCCTCGRC	选	有	11
OPC-14	TGCGTGCTTG	选	有	12
OPC-15	GACGGATCAG	不选 [⊕]	无	2
OPC-16	CACACTCCAG	选	有	8
OPC-17	TTCCCCCAG	不选*	/	/
OPC-18	TGAGTGGGTG	不选*	有	5
OPC-19	GTTGCCAGCC	选	有	8
OPC-20	ACTTCGCCAC	选	有	8

★ 无扩增谱带, * 个体内扩增结果不一致, ⊕ 扩增带少且无多态。

3.2 梭鱼群体遗传多样性分析

11个扩增效果稳定的引物用于两个群体共计39个个体的RAPD分析.图1和图2列出了引物OPC05对两个群体的扩增产物的电泳图谱.11个引物共检出112个位点,其中106个表现多态.养殖群体在94个位点上表现多态,多态位点比例(P_c)为83.93%;自然群体在96个位点上表现多态,多态位点比例(P_n)为85.71%(表2),可见这11个引物在两个梭鱼群体中检测到了比较丰富的遗传多样性.另外,遗传多样性指数(H)的计算结果(养殖群体的 H_c 为0.2124,自然群体的 H_n 为0.2271)(见表3)也表明,这两个梭鱼群体在DNA水平有比较丰富的遗传多样性.

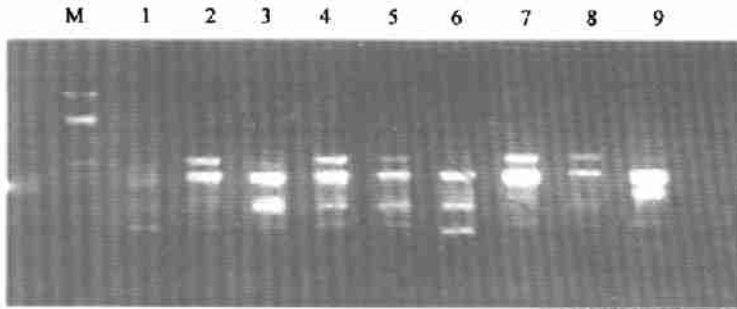


图1 随机引物 OPC-05 对梭鱼养殖群体的扩增图谱

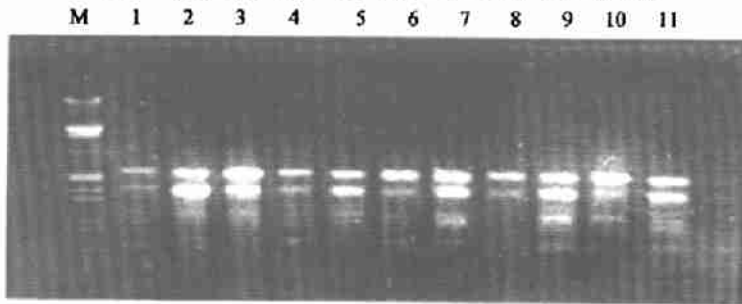


图2 随机引物 OPC-05 对梭鱼自然群体的扩增图谱

3.3 梭鱼自然群体和养殖群体之间的遗传差异

11个引物共检出97个位点为两个群体所共享(表2),两者的遗传相似性系数高达92.82%,遗传距离 F 仅为0.0718(见表3).由表3还可看出这两群体的遗传多样性指数(H)相差不明显,两者的多态位点比例(P)也比较接近,可见梭鱼两群体之间无明显的遗传差异,其丰富的遗传多样性主要由群体内个体间的差异造成,与群体间的遗传分化无关.这表明人工养殖过程对黄河口海域梭鱼的遗传多样性并未造成明显的影响.

表2 11种引物在两个梭鱼群体的扩增结果

引物	自然群体		养殖群体		两群体共享位点数	总位点数
	位点数	多态位点数	位点数	多态位点数		
OPC-01	10	10	12	12	10	12
OPC-02	10	9	11	9	10	11

续表

引物	自然群体		养殖群体		两群体共享位点数	总位点数
	位点数	多态位点数	位点数	多态位点数		
OPC-05	9	9	10	7	9	10
OPC-08	12	11	12	10	12	12
OPC-09	9	8	9	7	8	10
OPC-11	10	9	9	8	9	10
OPC-13	9	8	10	10	8	11
OPC-14	11	11	10	10	9	12
OPC-16	8	7	7	6	7	8
OPC-19	7	6	8	7	7	8
OPC-20	8	8	8	8	8	8
合计	103	96	106	94	97	112

表 3 两群体遗传多样性参数比较

群体	位点数	多态位点数	<i>P</i>	<i>H</i>	<i>F</i>	<i>D</i>
自然群体	103	96	85.71%	0.227 1	92.82%	0.071 8
养殖群体	106	94	83.93%	0.212 4		

4 讨论

4.1 梭鱼人工养殖群体和自然群体的遗传多样性比较

一般而言,人工繁殖会造成种群遗传多样性降低,主要原因在于 founder 效应(founder effect)或遗传漂变以及人工繁殖过程中一些人为的不合理因素(如繁殖亲鱼数量太少、近亲繁殖、定向选择及缺乏科学等)^[5],因此,分析比较自然群体与养殖群体的遗传多样性对于反映人类活动对鱼类基因库的影响程度具有重要的参考价值.由本研究结果来看,黄河口海域梭鱼人工养殖群体的遗传多样性没有显著降低,而且养殖群体与自然群体之间无明显的遗传分化.笔者认为,这可能与梭鱼的人工养殖比较粗放、人为干涉因素少有关.根据养殖场原始记载,本研究养殖梭鱼样本来源群体的育苗历史比较短(连续养殖 2~3 代),亲鱼多捕捞于自然群体,而且在整个养殖过程中很少有定向选择和近亲繁殖.

4.2 梭鱼人工养殖业的发展前景

由遗传学角度来讲,一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关.遗传多样性的降低可导致其适应能力降低、有害隐性基因增加及经济性状衰退,最终导致物种退化.丰富的遗传多样性意味着比较高的适应生存潜力,蕴涵着比较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良的潜力.通过与条纹鲈^[6]、中华鲟^[7]等其他鱼类 RAPD 研究结果的横向比较(见表 4),可以看到本研究的两个梭鱼群体的多态位点比例和遗传多样性指数都远远高于其他鱼,这说明目前黄河口海域梭鱼群体的遗传多样性比较丰富.这一结果向我们表明,以维持现有的遗传多样性为前提,注意人工繁殖过程各环节的科学性和合理性,如维持亲鱼的有效群体、避免近亲繁殖、增加系统选择的科学性,梭鱼的人工养殖业在黄河口海域

将有很好的发展前景.

表4 不同鱼类 RAPD 研究结果比较

种名	个体数	引物数	P	H	文献来源
条纹鲈	103	5	49.06%	/	Bielawski ^[6]
中华鲟	70	26	43.00%	0.033 4	张四明 ^[7]
养殖梭鱼	15	12	83.93%	0.212 4	本研究
野生梭鱼	24	12	85.71%	0.227 1	本研究

样品采集过程中得到河北省水产研究所赵振良先生、农业部黄、渤海区渔政渔港监督管理局孙建宏先生及河北省黄骅市水产局的大力支持和协助,在此表示衷心的感谢!

参考文献

- 1 张四明. 分子生物技术及其在渔业科学中的应用. 水产学报, 1997, 21(增刊): 97~109
- 2 邱芳, 伏建民, 金德敏, 等. 遗传多样性的分子检测. 生物多样性, 1998, 6(2): 143~150
- 3 Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 1995, 38: 201~210
- 4 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478~484
- 5 吴力钊, 王祖熊. 长江中游鲢鱼天然种群的生化遗传结构及变异. 水生生物学报, 1997, 21(2): 157~162
- 6 Bielawski J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass. *Heredity*, 1997, 78: 32~40
- 7 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 中华鲟(*Acipenser sinensis*)随机扩增多态DNA及遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 2000, 31(1): 1~7

Genetic variation analysis of two mullet populations through randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) method

Quan Jiexia,¹ Dai Jixun,¹ Shen Songdong,¹ Deng Jingyao,² Zhuang Zhimeng²

1. Marine Life College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003

2. Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071

Abstract—RAPD method is explored to investigate the genetic variation between cultivated population(CP) and natural population(NP) of mullet (*Liza haematocheila*) distributed in waters of the Huanghe River Estuary. Using 11 decamer random primers, 112 RAPD sites are detected in the 39 fishes. The high percentage of polymorphic sites (83.93% in CP, 85.71% in NP) and the high genetic diversity index (*H*) (0.212 4 in CP, 0.227 1 in NP) show rich genetic diversity in the two mullet populations. The big genetic similarity index (*F* = 92.82%) and the small genetic distance (*D* = 0.071 8) indicate that there is not obvious genetic differentiation between the two populations, which suggests that aquaculture has generated little reduction in genetic diversity of mullet in this area. The results suggest that aquaculture of mullets will be a promising industry in the area of the Huanghe River Estuary.

Key words Mullet (*Liza haematocheila*), RAPD, genetic variation, population analysis