

宫井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析

王 军¹, 全成干¹, 苏永全¹, 邝雄¹, 张 纹¹

(1. 厦门大学 海洋学系 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对取自宁德宫井洋闽一粤东族大黄鱼的野生种群和养殖群体进行遗传多样性分析. 结果表明, 野生种群的平均多态性为 18.9%, 平均遗传差异度为 0.096 0; 养殖群体的分别为 16.7% 和 0.074 7; 野生种群与养殖群体之间的相似系数为 0.995 9, 遗传距离为 0.004 1. 分析结果表明宫井洋大黄鱼野生种群和养殖群体遗传多样性水平较低的主要原因在于过度捕捞、有效繁育群体数量偏少及值得探讨的人工放流等. 提出宫井洋大黄鱼仍具有一定的变异潜力, 尽快采取有效的管理保护措施, 可以保持乃至提高大黄鱼现有的遗传多样性水平.

关键词: 大黄鱼; 遗传多样性; PAPP

中图分类号: Q953; Q523

文献标识码: A

文章编号: 0253- 4193(2001)03- 0087- 05

1 引言

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson) 曾是我国著名的四大海洋渔业对象之一, 因过度捕捞, 大黄鱼资源遭受极大破坏, 早已无法形成渔业. 20 世纪 80 年代初, 福建省有关部门立项“大黄鱼人工繁殖及育苗技术研究”, 尤其是在国家“七五”重点攻关项目和福建省科技星火计划的支持下突破了育苗难关, 并率先在福建省进行大黄鱼的人工养殖和放流. 1998 年仅福建省就有大黄鱼养殖网箱 7 万个, 土池 533.3 hm², 产量超万吨, 创产值 5 亿元, 经济效益显著, 是我国养殖鱼类中产量最高的一种. 但是, 近 10 a 的大规模养殖实践, 大黄鱼人工养殖群体普遍出现了生长缓慢、个体小、性成熟提早等生物学性状退化现象. 已有研究表明, 养殖鱼类生物学性状的衰退与养殖群体遗传多样性的丧失有直接的关系. 本课题组已采用 PAGE 法对宫井洋闽一粤东族大黄鱼野生种群和养殖群体同工酶遗传多样性进行了检测, 初步揭示了野生种群和养殖群体之间遗传多样性的差异¹⁾. 在此基础上, 本文采用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法在分子水平上进一步对宫井洋大黄鱼野生种群和养殖群体的遗传多样性

收稿日期: 1999- 12- 06; 修订日期: 2000- 08- 10.

基金项目: 国家教育部博士点基金资助项目(97038409).

作者简介: 王 军(1953—), 女, 江苏省宝应县人, 副教授, 硕士, 从事海水鱼类的种质资源与病害防治研究.

1) 本实验室工作, 待刊.

进行更深入地研究, 探讨养殖大黄鱼生物学性状退化内在因素, 为养殖大黄鱼种质的改良和养殖业的健康持续发展提供依据.

2 材料和方法

本文所用养殖群体样本是 1999 年 5 月 29 日取自宁德市三都镇渔塘村养殖网箱(20 尾), 健康状况良好, 平均体长为 19.6 cm(15.2~24.0 cm), 平均体重为 138.3 g(60.3~260.5 g).

表 1 OPV 系列 20 个引物的 DNA 序列

引物	序列(5' - 3')
OPV- 01	T C A C G C A T G G
OPV- 02	A G T C A C T C C C
OPV- 03	C T C C C T G C A A
OPV- 04	C C C C T C A C G A
OPV- 05	T C C G A G A G G G
OPV- 06	A C G C C C A G G T
OPV- 07	G A A G C C A G C C
OPV- 08	G G A C G G C G T T
OPV- 09	T G T A C C C G T C
OPV- 10	G G A C C T G C T G
OPV- 11	C T G C A C A G A G
OPV- 12	A C C C C C A C T
OPV- 13	A C C C C C T G A A
OPV- 14	A G A T C C C G C C
OPV- 15	C A G T G C C G G T
OPV- 16	A C A C C C C A C A
OPV- 17	A C C G G C T T G T
OPV- 18	T G G T G G C G T T
OPV- 19	G G G T G T C A G
OPV- 20	C A G C A T G G T C

野生种群样本是 1999 年 5 月 18~26 日捕自宁德市三都澳东冲口外官井洋海区(20 尾), 平均体长为 19.4 cm(10.8~27.2 cm), 平均体重为 115.7 g(52.8~174.3 g), 暂养至 5 月 29 日取样分析.

随机引物为 Operon 公司的 OPV 系列(表 1). 按 DNA 标准抽提方法^[1]并加以改进, 从鱼体肌肉提取基因组 DNA.

PAPD 反应在 PE9700 型 PCR 仪上进行. 反应体系(25 mm³)中包括: 无菌 DDW 16 mm³, 10 × buffer (Mg²⁺ free) 2.5 mm³, 2.5 mmol dNTP 1 mm³, 4 U/mm³ Taq 酶 0.25 mm³, Mg²⁺ (25 mmol) 2.0 mm³, DNA 样品(12.5 ng/mm³) 2 mm³和 Primer(25 pmol) 1.25 mm³. 测定循环条件为: 94 °C 2 min → (93 °C 1 min → 36 °C 1 min → 72 °C 2 min) × 45recycles → 72 °C 5 min.

PAPD 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 紫外灯下观察、拍照. 数据处理采用 PAPDistance Package- Version 1.04 软件分析.

样品个体间相似系数 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ^[8],

其中: S 为 x, y 个体间相似系数, N_x 和 N_y 为第 x 和 y 个体拥有的 RAPD 标记数; N_{xy} 为 x, y 两个个体共享的 PAPD 标记数.

多态位点频率 f = 具有该位点的样本数 / 总样本数;

遗传差异度 = 1 - 遗传相似系数;

群体间的遗传相似系数 $I = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$;

遗传距离 $d = -\ln I$;

t 检验: $t = \sqrt{\frac{(n-2)I^{[2]}}{1-I^2}}$.

3 结果

3.1 RAPD 的扩增结果

RAPD 标记符合孟德尔遗传规律^[3,4], 为共显性遗传标记, 所以常以一个扩增产物片段做

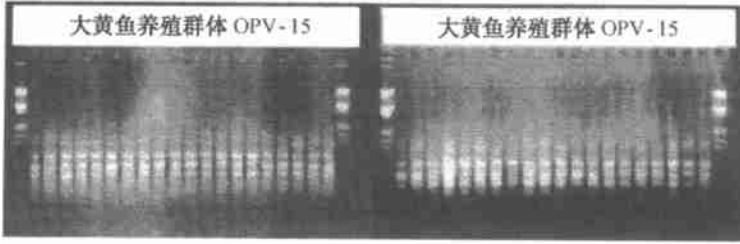


图1 随机引物 OPV-15 在大黄鱼野生种群和养殖群体中 DNA 扩增电泳照片

为一个位点进行分析^[5,6]. 本实验所采用的 20 个引物中, 除 OPV-10, OPV-11, OPV-13 和 OPV-19 无扩增产物外, 野生种群和养殖群体的 16 个引物共扩增出 90 条 DNA 片段, 单个引物扩增出的产物为 2~8 个 DNA 片断, 片断大小在 500~1 200 0 bp 之间. 扩增结果表明实验所用 OPV 系列引物对于大黄鱼基因组来说, 检测到的位点还是比较多的.

3.2 DNA 扩增产物的多态性

在检测到的 90 个位点中, 野生种群具有多态性的位点为 17 个, 养殖群体为 15 个, 多态位点比例分别为 18.9% 和 16.7%. 各多态位点的基因频率列于表 2. 表中可见, 野生种群除 Opv-9-1 多态位点频率低于养殖群体, Opv-9-2, Opv-15-1, Opv-20-2 多态位点频率与养殖群体相同外, 其余的多态位点出现频率均明显高于养殖群体.

3.3 遗传相似率和遗传差异

宫井洋海区的闽—粤东族大黄鱼野生种群的遗传相似系数为 0.875~0.975, 平均 0.904, 遗传差异度为 0.096 0; 养殖群体的遗传相似系数为 0.846~0.986, 平均 0.925, 遗传差异度 0.074 7. 野生种群与养殖群体之间的相似系数为 0.995 9, 遗传距离为 0.004 1, t 检验值为 31.04.

4 讨论

与同工酶技术相比较, 虽然 RAPD 不能区分显、隐性基因, 但它能克服同工酶技术中电泳图谱的状况受到基因表达过程中的转录和翻译、环境因子及生物个体发育状态的影响, 也弥补了同工酶所能分析的位点数有限, 而根据有限位点获得的遗传多样性不一定能代表整个基因组实际情况的不足. 已有资料证实, 如果用于分析的位点很多, 而且被分析样品的平均杂合度很低时, 整个群体杂合度的分析受所分析位点数的影响远大于受所取样个数的影响^[7], 故所取样品个数可以较少^[8]. 笔者在对同一样品的野生和养殖大黄鱼同工酶多样性的检测中已经证实所分析的宫井洋野生和养殖大黄鱼的平均杂合度偏低, 本文的 PAPD 标记已提供了足够

表 2 多态位点频率

多态位点	多态位点频率	
	野生种群	养殖群体
Opv-4-1	0.15	0.10
Opv-4-3	0.20	0.05
Opv-4-4	0.10	0.05
Opv-4-5	0.15	0.10
Opv-6-5	0.05	---
Opv-8-1	0.45	0.20
Opv-9-1	0.25	0.50
Opv-9-2	0.05	0.05
Opv-9-4	0.10	---
Opv12-4	0.60	0.35
Opv12-5	0.35	0.25
Opv12-6	0.85	0.30
Opv15-1	0.30	0.30
Opv18-2	0.85	0.15
Opv-20-1	0.45	0.15
Opv-20-2	0.10	0.10
Opv-20-3	0.55	0.15

* :“ ---”表示未发现多态位点.

的位点信息,所以可以认为本文的分析结果基本上代表了闽—粤东族野生和养殖大黄鱼整个基因组的实际情况。

遗传距离常用于说明群体之间的相对关系,本文野生与养殖大黄鱼的遗传距离为 0.004 1, t 检验值 31.04, 显著不为 0, 说明官井洋大黄鱼的养殖群体与野生种群之间有着十分密切的关系。但是,由遗传差异度来看,大黄鱼野生种群的遗传多样性水平要高于养殖群体,这与同工酶检测结果是一致的。在生产实践中,人工养殖的大黄鱼表现出的生长缓慢、个体小、体色欠佳、性成熟提早等经济性状退化现象与养殖群体的遗传多样性水平较低有一定关系。养殖群体遗传多样性水平较低又与多年来用于育苗的大黄鱼亲鱼数量明显小于“要维持一个随机交配的种群,至少需要 50 对亲鱼或 50 尾可产卵的雌体”^[9]的数量有关,因为一个较小的有效繁育群体往往不能具备原种群的所有基因类型,必然产生遗传变异的丧失。

本研究检测的官井洋大黄鱼野生种群和养殖群体遗传多样性均比脊椎动物的平均值(24.7%)要低,可见,官井洋的大黄鱼不仅养殖群体中存在种质退化现象,野生种群中的遗传多样性水平也不高。这可能与下述两方面的因素有直接的:(1) 过度捕捞使自然海区大黄鱼数量急剧减少,有效亲本群体变小,定向选择增强,从而可能产生不同程度的“瓶颈”、漂变和近交效应,引起群体中某些稀有基因的丧失,导致种质资源的遗传组成趋向同质化,资源衰退。这种现象与大西洋鲑鱼(*Haplostethus atlanticus*)由于过度捕捞资源量下降了 60%~70%,在同工酶电泳技术研究中表现出遗传杂合度明显的下降^[10]的情况相似;(2) 几年来,所放流的遗传多样性相对较低的大黄鱼人工苗在自然海区与天然幼鱼具有一样的分布特点^[11],成熟后极可能与野生大黄鱼“杂交”造成自然海区大黄鱼种群的遗传稀释或遗传渐渗,降低其遗传多样性水平。

由分析结果来看,闽—粤东族官井洋野生和养殖大黄鱼的遗传多样性(18.9%和 16.7%)虽然明显低于一般脊椎动物的平均值 24.7%,但仍略高于脊椎动物(14.5%~33.6%)的下限 14.5%,表明该族大黄鱼种群仍具有较广泛的遗传变异潜力。因此,在人工育苗过程中,应采取有效措施防止遗传多样性进一步的丧失,并避免人工繁育的大黄鱼对野生种群的污染。同时应尽快设立大黄鱼原种场和保护区,在现有的基础上加强对大黄鱼种质资源的保护,并且积极开展种质资源恢复工作,以实现大黄鱼资源的可持续利用。

参考文献:

- [1] 曼尼阿蒂斯 J, 萨姆布鲁克 J, 弗里奇等著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 熊全沫. 同工酶电泳数据的分析及其在种群遗传上的应用[J]. 遗传, 1985, 8(1): 1~5.
- [3] MARIA E D, DANIEL C. Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii* evaluated by RAPD analysis[J]. Journal of Crustacean Biology, 1996, 16(4): 578~588.
- [4] WILLIAMS J G K, ANNER K, KENNETH J A R, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6 531~6 535.
- [5] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 68(12): 954~962.
- [6] WELSH J, MICHAEL M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7 213~7 218.
- [7] GORMAN G C, RENZI Jr J. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoresis studies: effect of sample size

- [J]. *Copelia*, 1979, 2: 242~ 249.
- [8] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583~ 590.
- [9] 李思发. 中国淡水鱼类种质资源和保护[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [10] SMITH P J. Loss of genetic diversity due to fishing pressure[J]. *Fishery Research*, 1991, 10: 309~ 311.
- [11] 刘家富, 翁忠钊, 唐晓刚, 等. 官井洋大黄鱼标志放流技术与放流标志鱼早期生态习性的初步研究[J]. *海洋科学*, 1994, 5: 53~ 57.

RAPD analysis of the reared and wild *Pseudosciaena crocea*

WANG Jun¹, QUAN Cheng-gan¹, SU Yong-quan¹, DING Shao-xiong¹, ZHANG Wen¹

(1. *Department of Oceanography & Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

Abstract: Genetic diversity of DNA in both reared and wild large yellow croaker *P. crocea* (Richardson) stocks collected from Bay Sandu'ao in Ningde on May 29, 1999 is analyzed by RAPD. The DNA genetic diversity of wild population is relatively low, with 18.98% of the polymorphism and 0.096 0 of the mean difference. However, the genetic diversity of reared stock is lower than that of the wild one with just 16.7% of the polymorphism and 0.074 7 of the mean difference. The results from the practical fish culture and the this study reveal that genetic diversity of both *P. crocea* stocks has seriously been lost since the 1990s. In order to protect and use the good genetic characteristics of *P. crocea* continuously, some suggestions are conducted.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; genetic diversity; RAPD