

金焰笛鲷与金带笛鲷的 RAPD 分析 *

刘 丽 刘楚吾 ** 许 强

(湛江海洋大学海洋生物研究所 湛江 524025)

提要 应用 RAPD 技术, 对笛鲷属的金焰笛鲷 (*Lutjanus fulci flamma*)、金带笛鲷 (*Lutjanus vigiensis*) 进行种群内及种群间遗传学分析。结果表明两种鱼的种内遗传多样性指数 (H_i) 分别为: 金带笛鲷 0.1107; 金焰笛鲷 0.1673。二者的多态位点比例 (P) 分别为 47.8% 和 59.0%。2 种笛鲷种间平均遗传相似系数为 0.4640, 遗传距离 D_{pq} 为 0.5360。2 种鱼共检出 6 个可作为种的特异性鉴定的条带。

关键词 金焰笛鲷 (*Lutjanus fulci flamma*), 金带笛鲷 (*Lutjanus vigiensis*), 遗传多样性, 种质鉴定, RAPD

中图分类号 Q953.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)10-0059-04

金焰笛鲷 (*Lutjanus fulci flamma*)、金带笛鲷 (*Lutjanus vigiensis*) 隶属于笛鲷科 (Lutjanidae)、笛鲷属 (*Lutjanus* Bloch), 属近海暖水性近底层鱼类, 栖息海区范围广, 繁殖能力强, 发育和生长快, 且肉质丰厚坚实, 营养丰富, 味道鲜美, 属于捕捞品种中经济价值较高的种类, 但目前有关这 2 种鱼的基础研究较少, 为了充分开发和保护鱼类资源、建立种质资源管理和保存体系, 本文采用 RAPD 标记技术对这 2 种鱼的种质特异性标记 遗传多样性进行了研究。

RAPD (Random amplified polymorphic DNAs) 标记技术目前已广泛应用于生物的遗传多样性、群体遗传、亲缘关系分析、遗传连锁图的构建、特定基因的标记和定位等许多研究领域^[1-4]。本文应用该技术对金焰笛鲷、金带笛鲷进行了分析, 为此 2 种鱼的种质资源保护提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用活鱼是分批采集于湛江近海的野生鱼种, 依据《中国鱼类系统检索》^[5] 进行鉴定, 断尾取血, ACD 抗凝, -20℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 所用随机引物为美国 Operon Technologies 公司产品, Taq DNA 聚合酶及其配套试剂、dNTPs、PCR Markers 等为 Pharmacia 公司产品, PCR 扩增仪为 He ma480。

1.2.2 基因组 DNA 的制备 核 DNA 制备参照《现代分子生物学实验技术》^[6], 略作修改。冷冻血液室温解冻后, 取 50 μ L 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加 STE (NaCl 0.1 mol/L; Tris-HCl 10 mmol/L, pH=8.0; EDTA 1 mmol/L, pH=8.13) 500 μ L 漂洗, 8 000 r/min 离心 2 min, 收集细胞沉淀, 重复 1~2 次; 加入 STE 50 μ L, 悬浮沉淀, 向悬液中加入 DNA 裂解液 (Tris-HCl 10 mmol/L, pH=8.0; EDTA 0.1 mol/L, pH=8.0; SDS 5 g/L) 450 μ L, 轻摇混匀后加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/mL, 55℃ 消化至血样透明; 等体积苯酚/氯仿 (1:1)、氯仿各抽提一次, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 挑出絮状沉淀; 70% 酒精洗涤 2 次, 室温干燥 DNA 5~10 min。溶解于适量 TE (Tris-HCl 10 mmol/L, pH=8.0; EDTA 1 mmol/L, pH=8.13) 中, 50℃ 水浴溶解, 紫外分光光度计定量, 置 4℃ 备用。

* 广东省重大科技兴海项目 A200099A01 号; 湛江市科技攻关项目 2000-17 号。

** 通讯作者, E-mail: swyjs@zjou.edu.cn

第一作者: 刘丽, 出生于 1974 年, 在读硕士, 研究实习员, 主要从事鱼类繁殖生物学研究。通信地址: 广东省湛江市解放东路 40 号, E-mail: zjouliuli@21cn.com

收稿日期: 2002-08-30; 修回日期: 2002-10-20

1.2.3 PCR反应 扩增反应混合液 25 μ L (KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, $MgCl_2$ 2.0 mmol/L, Triton $\times$ 100 1 g/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, 引物 15 ng, 基因组 DNA 20 ng, Taq DNA 聚合酶 1.5 U), 反应液上覆盖 25 μ L 矿物油。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 200 s 后进入循环扩增, 每循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 40 个循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 300 s。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L EB) 电泳分离, 电压 5 V/cm, 紫外分析仪观察并摄影记录。

1.2.4 数据处理 (1) 多态位点比例 $P = (\text{群体的多态位点数} / \text{位点总数}) \times 100\%$ 。(2) 根据公式 $d = k / \log M$ d 为 DNA 在电场中的迁移距离, M 为其片段大小, k 为常数。)以 PCR Markers 作为分子量大小标记物, 作图计算扩增片段分子量大小。(3) 参照 Wachira 等^[7]的公式 $H = - \sum X_i \ln(X_i / n)$ 计算群体内遗传多样性指数 H , 式中: 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) 参照 Lynch^[8]的方法计算个体间的遗传相似系数。某一

片段在一个位点上存在时记为 1, 否则记为 0。个体 X, Y 间的遗传相似系数: $S_{xy} = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$, 式中: N_{xy} 为两个个体 X 和 Y 共享 RAPD 条带数, N_x 和 N_y 分别为 X 和 Y 拥有的 RAPD 条带数。群体内的遗传相似系数 (S) 为群体内所有个体间两两比较的 S_{xy} 的平均值, 即平均遗传相似系数; 群体内的遗传距离 $D = 1 - S$ 。群体间的遗传相似系数 S_{pq} 是群体 p 和 q 中随机配对的两个个体间遗传相似系数 S_{ij} 的平均值, 即 $S_{pq} = \sum S_{ij} / (n_p n_q)$, 式中, S_{ij} 是群体 p 和 q 中随机配对的两个个体间遗传相似系数, n_p 和 n_q 是群体 p 和 q 中的样品数, $n_p n_q$ 是群体 p 和 q 中随机配对的数目; 群体间的遗传距离 $D_{pq} = 1 - S_{pq}$ 。

2 结果

2.1 引物筛选结果

在 9 个系列、180 个随机引物中共筛出 16 个引物。结果见表 1。

2.2 种内遗传多样性

表 1 16 个引物分别对 2 种笛鲷扩增的结果

Tab.1 Amplified results of two species of snapper using 16 random primers

物种	适用引物个数	平均条带数	平均位点数	平均共享位点数
金带笛鲷	10	8.7 $\pm$ 1.7	10.8 $\pm$ 2.4	5.5 $\pm$ 1.3
金焰笛鲷	7	7.4 $\pm$ 2.0	10.6 $\pm$ 2.5	4.3 $\pm$ 1.8

2 种笛鲷间进行 RAPD 分析, 各检出 108, 74 个位点, 种内遗传多样性指标见表 2。

表 2 2 种笛鲷种内遗传多样性指标

Tab.2 Intra-species genetic diversity index of two species of snapper

物种	$\bar{P}(\%)$	$\bar{S}$	$\bar{D}$	$\bar{H}$
金带笛鲷	47.8	0.8860	0.1140	0.1107
金焰笛鲷	59.0	0.8070	0.1930	0.1673

2.3 种间遗传多样性

2 种笛鲷间两两进行 RAPD 分析, 依据电泳图谱计算遗传相似系数和遗传距离见表 3。

表 3 2 种笛鲷种间遗传多样性指数

Tab.3 Genetic diversity index among two species of snapper

共适引物数	总位点数	S_{pq}	D_{pq}	d_{pq}
8	102	0.4640	0.5360	0.5452

2.4 种的鉴定条带

3 种引物 OPP19, OPV09, OPZ05 对 2 种鱼的扩增

共选出 6 个片段具有种的特异性, 可作为种的鉴别标记 (表 4, 图 1 ~ 3)。

表 4 种的鉴定条带及分子量

Tab.4 Characteristic bands of two species and their size

标记	金带笛鲷条带 (分子量)	金焰笛鲷条带 (分子量)
标记 1, 2	OPP19(750bp) *	OPP19(589bp)
标记 3, 4	OPV09(562bp)	OPV09(485bp)
标记 5, 6	OPZ05(445bp)	OPZ05(646bp)

注 * 所用引物的编号, 括号内为标记片段的大小。

另外, 对金带笛鲷筛出一个单态性引物 Cl6, 扩增结果见图 4。

3 讨论

3.1 实验数据的可靠性

根据周泽扬、夏庆友等^[9]以桑蚕和桑属植物为材料进行的研究结果: 在用 RAPD 技术进行生物系统学研究中, 选用一定数量的引物进行扩增, 每一种鱼至

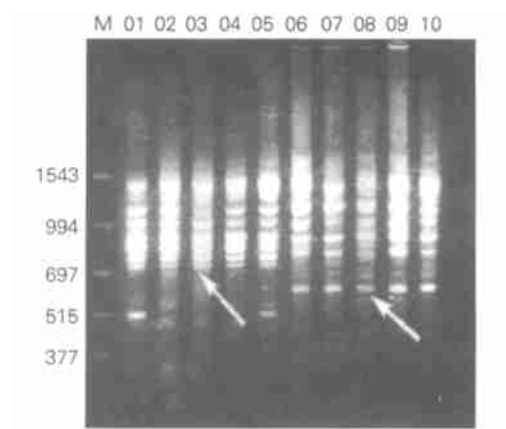


图1 OPPI9 对 2 种笛鲷的扩增结果

Fig.1 The RAPD result of 2 fishes by OPPI9
01 ~ 05. 金带笛鲷; 06 ~ 10. 金焰笛鲷; M. PCR Marker; 1543 ~ 377. Marker 的分子量(bp); 箭头所指为特异性条带

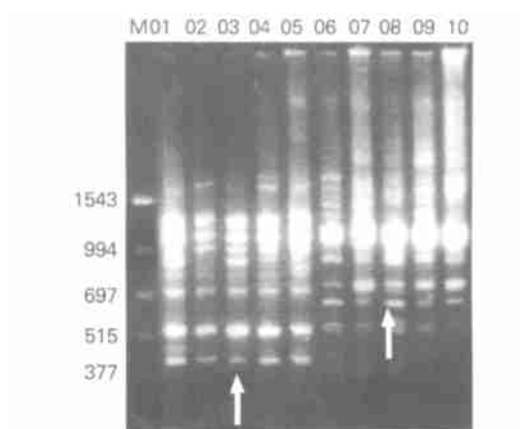


图3 OPZ05 对 2 种笛鲷的扩增结果

Fig.3 The RAPD result of 2 fishes by OPZ05
图中标号及箭头意义同图1

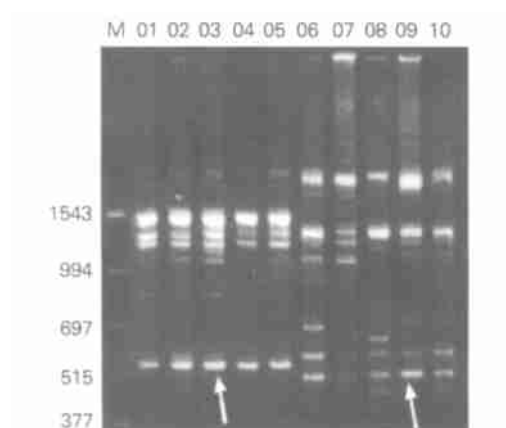


图2 OPV09 对 2 种笛鲷的扩增结果

Fig.2 The RAPD result of 2 fishes by OPV09
图中标号及箭头意义同图1

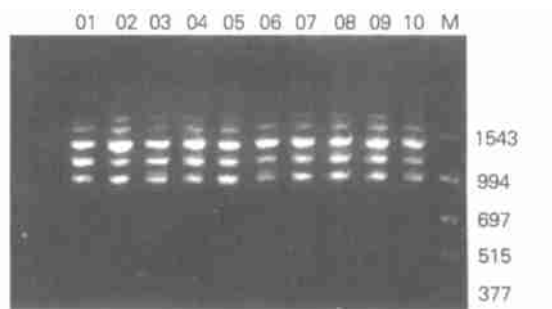


图4 OPCI6 对金带笛鲷不同个体的扩增结果

Fig.4 The RAPD result of *L. xanthurus* by OPCI6
01 ~ 10. 金带笛鲷的 10 个个体; M. PCR Marker; 1543 ~ 377. Marker 的分子量(bp)

少出现 70 个位点才能保证实验数据的稳定性和可靠性。所以本实验中每种鱼都以此为标准,从而保证了实验数据的可靠性。

3.2 种的鉴定标记

本次实验共筛选出 6 个特征性片段,可分别作为 2 个物种的遗传标记,但在我国海域笛鲷属的常见种类却有 19 种,属内其他种鱼是否也具此条带有待于对比全部 19 种鱼才能将每一种鱼的鉴定性条带最终确定下来。但本实验筛出的分子标记在本文研究的

2 种鱼范围内仍可作为种质鉴定标记。另外对于单态性引物,作者认为可作为该物种的特征性引物,相对于特征性条带,特征性引物更具可靠性。

3.3 种内遗传多样性

对 2 种笛鲷的种内遗传多样性研究表明:金焰笛鲷遗传多样性 ($S = 0.8070$) 高于金带笛鲷 ($S = 0.8860$)。多态位点比率亦为金带笛鲷 (47.8%) 高于金焰笛鲷 (59.0%)。但总的来说两者的遗传多样性都不丰富,作者认为其原因可能是湛江沿海该 2 种鱼群体较小,对人为干扰的抗性不大,容易受到大量捕捞的影响,所以应采取措施对其加强保护,控制捕捞强度,以保护此 2 种鱼的遗传变异水平,维持种群的繁

殖能力及生物资源的可持续利用。

参考文献

- 1 夏德全, 曹莹, 吴婷婷, 等. 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用. 水产学报, 1999, 23(1): 28-32
- 2 董在杰, 夏德全, 吴婷婷, 等. RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用. 中国水产科学, 1999, 6(1): 37-40
- 3 权洁霞, 戴继勋, 沈允东, 等. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析. 海洋学报, 2000, 22(5): 82-84
- 4 邹曙明, 楼允东. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和 3 个地理种群鲤的亲缘关系. 中国水产科学, 2000, 7(1): 6-11
- 5 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987. 上册, 329-331, 下册, 1113-1121
- 6 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 95-104
- 7 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
- 8 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478-484
- 9 周泽扬, 夏庆友, 鲁成. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系. 遗传, 1998, 20(5): 12-15

POPULATION GENETICS ANALYSIS ON TWO SPECIES OF SNAPPERS BY RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

LIU Li LIU Chun Wu XU Qiang

(Institute of Marine Biology, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, 524025)

Received: Aug., 30, 2002

Key Words: *Lutjanus fulvus*, *Lutjanus unigiensis*, Genetic diversity, Species identification, RAPD

Abstract

Twelve random primers are used in the population genetics analysis of two species of snappers: *Lutjanus unigiensis* and *L. fulvus* by RAPD technique. The genetic diversity indexes of intraspecies (H) are 0.1107 and 0.1673 respectively; the polymorphic loci ratios (P) are 47.8% and 59.0% respectively. Six specific markers are found, which can be used as molecular genetic markers to identify the two studied species.

(本文编辑:刘珊珊)