

# 大弹涂鱼自然种群遗传多样性的 RAPD 分析

金春华<sup>1</sup>, 钟爱华<sup>1,2</sup>, 黄福勇<sup>1</sup>, 张春丹<sup>1</sup>, 李明云<sup>1</sup>

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江海洋学院 渔业学院, 浙江 舟山 316000)

**摘要:** 2002年9月以采自浙江宁海三门湾海区的大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris* L.)为材料, 对大弹涂鱼自然种群的遗传多样性进行随机扩增多态 DNA(RAPD)分析, 20个引物共扩增出100个DNA片段, 多态位点比例(P)为21%, 任意两个个体间遗传相似度(F)最大为0.9938, 最小为0.9239, 平均为0.9645。任意两个个体间的遗传距离(D)最大为0.0761, 最小为0.0062, 绝大多数为0.02000~0.0500; 大弹涂鱼自然种群的平均杂合度(He)为0.2018, D平均值为0.0355; Shannon多样性指数(Ho)和Shannon多样性值(H)分别为5.918和0.0592。研究结果表明大弹涂鱼的遗传多样性水平比较低, 应加强大弹涂鱼种质资源的保护。

**关键词:** 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris* L.); 随机扩增多态 DNA; 遗传多样性

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)12-0026-05

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris* L.), 俗称花跳、星跳、花弹涂鱼等, 隶属于鲈形目、虎鱼亚目、弹涂鱼科、大弹涂鱼属, 系沿岸暖水广温广盐性两栖鱼类。广泛分布于中国沿海、朝鲜、日本南部、印尼、波里尼西亚、澳洲、印度和美洲沿岸的潮间带区域; 在中国主要分布于江、浙、闽、粤及台湾的沿海。大弹涂鱼的肉味鲜美, 营养丰富, 具有滋补功效, 深受国内外群众的喜爱。大弹涂鱼具有食物链短、鱼病少、易于养活, 耐长途运输等特点, 是一种有前途的滩涂养殖鱼类。目前, 有关大弹涂鱼的研究报道不多, 主要集中在形态特征、养殖繁育技术<sup>[1-3]</sup>、血细胞的发生<sup>[4]</sup>、性腺发育<sup>[5]</sup>等方面, 对其种质资源状况的研究相当薄弱。因此, 查明大弹涂鱼的遗传背景, 正确地评定大弹涂鱼的遗传多样性十分必要。作者采用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对一自然种群的大弹涂鱼 DNA 多态性进行了研究, 为大弹涂鱼的研究积累资料, 为进一步研究大弹涂鱼遗传特异性、种质鉴别、生物进化等提供一定的理论依据, 为大弹涂鱼的人工选种和定向育种提供遗传学指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2002年9月采自浙江宁海三门湾海区的大弹涂

鱼自然种群共30尾, 鱼龄1~2龄, 全长11~15 cm, 质量22.1~28.3 g, 活鱼运回实验室后, 解剖取其肌肉, 用滤纸吸去水分, 放入离心管中, -71℃超低温冰箱中冷冻保存备用。

RAPD反应体系中的化学试剂: Mg<sup>2+</sup>, dNTP, Buffer, 随机引物以及蛋白酶K, RNA酶, 饱和酚, 苯酚: 氯仿, 硼酸, TRIS, SDS, EDTA。基因组DNA提取试剂盒以及电泳琼脂糖等均购自上海生物工程有限公司。Taq+酶购自S<sub>ABC</sub>(华美)公司。其余为国产分析纯。

实验仪器: PCR扩增仪为Bio-RAD公司的iCycler型热循环扩增仪; 高速冷冻离心机为上海安亭科学仪器厂产品, 型号TGL-16G; 紫外/可见分光光度计为Bio-RAD公司的SmartSpec3000; 生物电泳图像分析仪上海复日公司产品, 型号FR-2000。

收稿日期: 2004-04-14; 修回日期: 2004-08-15

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(399428); 浙江省教育厅项目(20040895)

作者简介: 金春华(1964-), 男, 浙江东阳人, 讲师, 主要从事种苗繁育研究, E-mail: jchrnbu@mail.nbptt.zj.cn

1.2 方法

采用上海生物工程公司的 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒提取大弹涂鱼基因组 DNA, -20 °C 保存备用。RAPD 扩增反应总体积为 25 μL, 模板 DNA 100 ng、引物 1.5 μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 2 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, 10× Buffer 2.5 μL。25 μL 石蜡油覆盖。反应程序为, 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 38 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 40 循环, 最后在 72 °C 延伸 10 min, 历时 4 h 左右。扩增产物经 1.6% 琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色后, 用 FR-2000 生物电泳图象分析仪记录扩增产物电泳图谱。

1.3 数据处理

任意两个个体间遗传相似系数和遗传距离用下列公式计算:  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ,  $D = 1 - F$ 。式中,  $F$  为两个个体间遗传相似度;  $D$  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。当  $F = 1$  时, 物种  $X$  和物种  $Y$  的扩增片段完全相同, 二者高度相似; 当  $F = 0$  时, 二物种的扩增片段完全不同, 具有高度相异的遗传性。

多态位点比例  $P = (k/n) \times 100\%$ , 其中  $k$  为多态位点数,  $n$  为所测定位点的总数。多态位点频率  $f =$  具有该位点的样本数 / 总样本数。Shannon 遗传多样性指数  $H_o = - \sum \pi_i \ln \pi_i$ ,  $\pi_i$  为某一条带在某一群体中出现的频率<sup>[6]</sup>。Shannon 遗传多样性值  $H = - \sum \pi_i \ln \pi_i / N$ ,  $N$  为所测的座位数。种群的平均杂合度参照等位酶分析<sup>[7]</sup>的方法:

$$H_e = \sum_{i=1}^n (1 - \sum P_i) / n$$

$P_i$  为第  $i$  等位因的频率,  $n$  为所测位点总数。

2 结果

2.1 个体水平的 DNA 多态性

20 个引物共扩增出 100 个 DNA 片段 (表 1), 单个引物扩增出 1~8 个 DNA 片段, DNA 片段的长度范围为 500~14 000bp。平均每个引物产生出 5 个 DNA 片段, 说明检测到的位点还是比较多的。

在 20 个引物中, 引物 S34, S5, S287, S1, S106, S107, S109, S53, S43, S49, S293, S109, S22, S116, S37 共 15 个引物产生了不同程度的多态 RAPD 标记, 多态引物占总引物 (指带比较稳定的引物) 的 75%。图 1 显示了其中 8 个多态引物的电泳图谱。

表 1 用于 RAPD 分析用的随机引物序列及扩增情况

Tab. 1 RAPD primers and their sequence used in the analysis of the genetic diversity and the amplified results

引物	5' - 3' 序列	总扩增带数
S1	GTTTCGCTCC	6
S5	TGCGCCCTTC	4
S13	TTCCCCGCT	5
S15	GGAGGGTGT	4
S22	TGCCGAGCTG	2
S43	GTCGCCGTCA	5
S49	CTCTGGAGAC	5
S53	GGGTGACGA	5
S34	TCTGTGCTGG	3
S104	GGAAGTCGCC	5
S106	ACGCATCGCA	8
S107	CTGCATCGTG	8
S109	TGTAGCTGG	3
S111	CTTCCGCACT	5
S112	ACGCGCATGT	6
S116	TCTCAGCTGG	4
S119	CTGACCAGCC	7
S293	GGGTCTCGGA	4
S287	AGAGCCGTCA	4
S37	GACCGCTGT	6

在检测到的 100 个位点中, 具有多态现象的位点为 21 个,  $P$  为 21%。如果不考虑单态引物, 只计算多态引物, 多态座位比例可达到 27.27%。各多态位点频率见表 2。

根据大弹涂鱼种群内个体间 RAPD 任意两个个体间谱带的遗传相似度及遗传距离计算结果,  $F$  最大为 0.9938, 最小为 0.9239, 平均为 0.9645。任意两个个体间的  $D$  最大为 0.0761, 最小为 0.0062, 绝大多数为 0.0200~0.0500。

2.2 群体水平的 DNA 多态性

大弹涂鱼自然种群的 RAPD 扩增谱带变异不大。20 个引物中, 5 个引物的扩增带型在 20 个受试样品中均没有变化, 其余 14 个引物变化不大,  $f$  在 0.10~0.25 之间。在检测到的 100 个 RAPD 标记中, 有 79 个标记 (79%) 在整个群体的 20 个个体间表现稳定的一致性, 它们是进化中较为保守的区域。

大弹涂鱼自然种群的  $H_e$  为 0.2018,  $D$  平均值为 0.0355。大弹涂鱼的  $H_o$  和  $H$  分别为 5.918 和 0.0592。

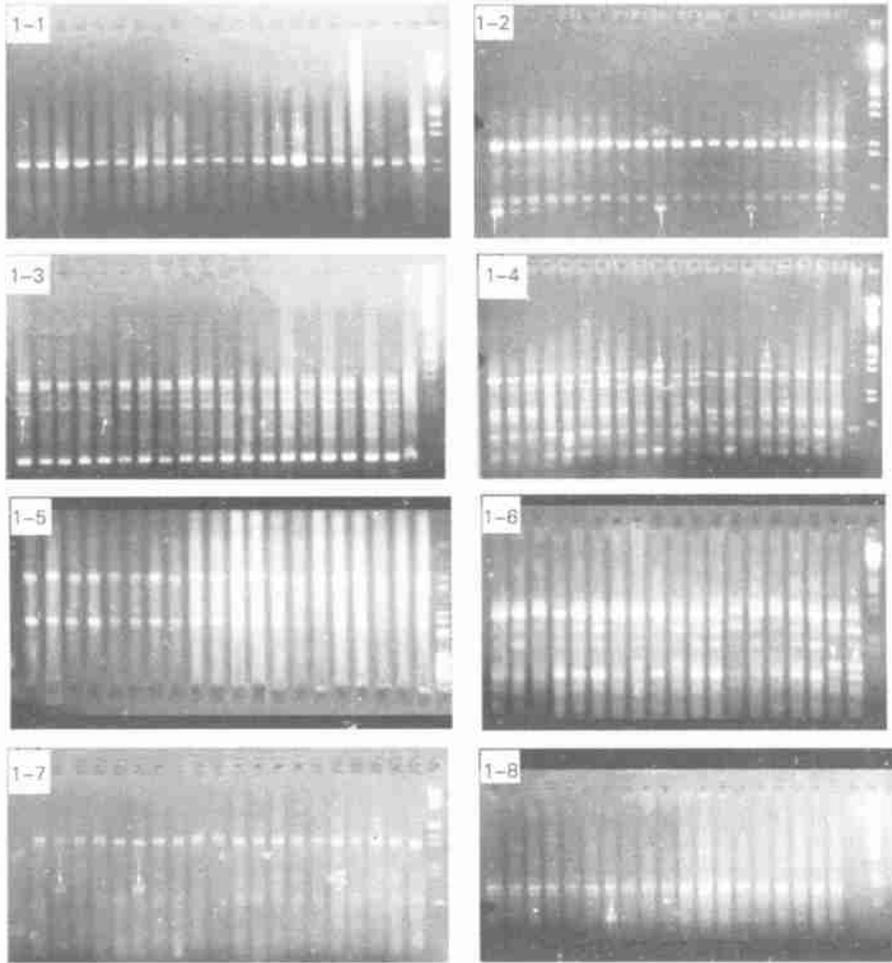


图 1 8 个多态引物的 RAPD 扩增结果

Fig. 1 RAPD amplified profiles generated by use of primers

1- 1.S22; 1- 2.S109; 1- 3.S119; 1- 4. S107; 1- 5.S5; 1- 6. S106; 1- 7.S53; 1- 8.S287; 箭头示多态位点

### 3 讨论

#### 3.1 大弹涂鱼遗传多样性评价

Bielawski 等用 RAPD 技术研究了大西洋沿海岸条纹鲈 (*Moron saxatilis*) 不同种群遗传结构, 在可分析的引物中, 75% 的引物为单态引物, 并指出大西洋沿海岸条纹鲈核基因组遗传变异较低<sup>[8]</sup>。作者研究结果显示, 多态引物占总引物 (指带比较稳定的引物) 的 75%, 说明该种群的大弹涂鱼核基因组存在一定水平的遗传变异。就多态位点来说, 脊椎动物遗传多样性的多态位点比例平均值为 24.7%, 而研究发现大弹

涂鱼的多态位点比例为 21%, 明显低于脊椎动物的平均值。

权洁霞等用 RAPD 技术研究人工养殖和野生梭鱼的遗传多样性表明, 养殖群体的  $H_o$  为 0.2124, 自然种群的  $H_o$  为 0.2271, 得出梭鱼遗传多样性比较丰富的结论<sup>[9]</sup>; 宋平等对黄颡鱼 RAPD 标记及遗传多样性进行了研究, A 和 B 两种群的  $H_o$  分别是 0.0639 和 0.0465, 本研究得出大弹涂鱼的  $H_o$  与其相近<sup>[10]</sup>; 张四明等研究中华鲟的遗传多样性 RAPD 结果表明, 中华鲟的  $H_o$  为 0.0334, 得出中华鲟遗传多样性比较低的结论<sup>[11]</sup>。大弹涂鱼的  $H_o$  为 0.0529, 由此说明大弹

表 2 多态位点频率

Tab. 2 Frequencies of the polymorphic loci

<i>k</i>	<i>f</i>
S34- 3	0.10
S5- 3	0.15
S287- 1	0.10
S287- 4	0.10
S1- 3	0.20
S106- 5	0.20
S107- 1	0.20
S107- 4	0.10
S107- 7	0.10
S109- 3	0.15
S109- 4	0.10
S53- 3	0.25
S53- 5	0.10
S43- 4	0.15
S49- 5	0.20
S293- 3	0.45
S109- 3	0.35
S22- 1	0.15
S116- 3	0.10
S116- 5	0.25
S37- 4	0.10

表 3 不同动物及鱼类 RAPD 研究结果比较

Tab. 3 Comparison of the RAPD results in different species

种类	<i>P</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>H</i>	文献来源
条纹鲈	49.09	-	-	-	-	[ 8 ]
养殖梭鱼	93.93	0.2124	-	-	-	[ 9 ]
野生梭鱼	85.71	0.2271	-	-	-	[ 9 ]
黄颡鱼 A	28.42	0.0639	0.9067	0.0933	-	[ 10 ]
黄颡鱼 B	26.09	0.0465	0.9320	0.0680	-	[ 10 ]
中华鲟	11.10	0.0334	0.9743	0.0267	-	[ 11 ]
大弹涂鱼	21.00	0.0592	0.9645	0.0355	0.2018	本文

参考文献:

[ 1 ] 洪万树, 张其永, 黄富铁. 大弹涂鱼受精卵孵化技术 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(2): 241-245.

[ 2 ] 张其永, 洪万树. 大弹涂鱼人工繁殖和仔稚鱼培育研究[J]. 厦门大学学报自然科学版, 1987, 26(3): 366-371.

[ 3 ] 林叔森, 方家仲. 大弹涂鱼养殖技术研究[J]. 浙江水产学院学报, 1995, 14(2): 96-104.

[ 4 ] 李长玲, 曹伏君, 刘楚吾, 等. 大弹涂鱼血细胞发生的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 10-14.

[ 5 ] 谢湘筠, 张其永. 大弹涂鱼雌性性腺发育研究[J]. 台湾海峡, 1990, 9(3): 221-217.

[ 6 ] Wachira FN, Waugh R, Hackett C A, *et al.* Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. *Genome*, 1995, 38: 201-210.

[ 7 ] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.

[ 8 ] Bielawski J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast strip bass [J]. *Heredity*, 1996, 78: 32-40.

[ 9 ] 权洁霞, 戴继勋, 沈颂平, 等. 梭鱼人工养殖群体和自然群体的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. 海洋学报, 2001, 22(5): 82-87.

[ 10 ] 宋平, 潘云峰, 向筑, 等. 黄颡鱼 RAPD 标记及其遗传多样性的初步分析[J]. 武汉大学学报(自然科学版) 2001, 47(2): 233-237.

[ 11 ] 张四明, 邓怀, 晏勇. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(1): 1-7.

[12] 李思发, 吴力钊, 王强, 等. 长江、珠江、黑龙江鲢、1990.  
鳙、草鱼种质资源研究[M]. 上海: 上海科技出版社,

## The research on genetic diversity of *Boleophthalmus pectinirostris* L. from natural population by RAPD method

JIN Chun- hua<sup>1</sup>, ZHONG Ai- hua<sup>1, 2</sup>, HUANG Fu- yong<sup>1</sup>, ZHANG Chun- dan<sup>1</sup>, LI Ming- yun<sup>1</sup>

(1. Life Science and Biological Engineering College of Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Marine Fishery College of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 31600, China)

**Receives** Apr., 14, 2004

**Key words:** *Boleophthalmus pectinirostris* L.; randomly amplified polymorphic DNA; genetic diversity

**Abstract:** Randomly amplified polymorphic DNA method was used to investigate the genetic diversity of mud skipper population (20 fishes) from Ninghai sea area Zhejiang Province. Using 20 decamer random primers, 100 RAPD sites were detected, 21 of which were polymorphic, and percentage of polymorphic loci ( $P$ ) was 21%. The genetic similarity index between individuals was 0.9645 on average, ranging from 0.9239 to 0.9938. Genetic distance is 0.0355 on average. Mean heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.2018. Shannon Weveis index of phenotypic diversity and Shannon Weveis value of phenotypic diversity was 5.918 and 0.0592 respectively. The results indicated that the genetic diversity of *Boleophthalmus pectinirostris* L. was low.

( 本文编辑: 刘珊珊)