

黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究

许广平, 仲霞铭, 丁亚平, 刘培庭, 汤建华, 许璞

(江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

摘要: 以黄海南部吕泗渔场的小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)群体为研究对象, 采用 ISSR 技术对其遗传多样性进行分析。在使用的 99 个引物中, 有 10 个引物可扩增出清晰稳定的条带, 共计 64 条, 分子质量在 300~3 000 bp。其中多态性片段 42 条, 多态性片段比例为 65.63%, 个体间相似性系数 0.666 7~0.876 4, 平均为 0.781 3, 个体间平均遗传差异为 0.218 7。Shannon 多样性指数 12.083 2, 多样性值 0.188 8。表明黄海南部小黄鱼群体保持较高的遗传多样性, 具有较大的变异潜力。提出应采取有效管理保护措施, 以维持小黄鱼群体的遗传多样性水平, 使该渔业资源得到合理利用。

关键词: 小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*); 遗传多样性; ISSR

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)11-0034-05

小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)为广泛分布于渤海、黄海和东海北部的暖温性底层鱼类, 是我国重要的海洋渔业经济种类。在上世纪 50 年代小黄鱼渔业盛期, 年平均渔获量高达 12.8 万 t, 是我国近海的主要捕捞作业对象。到 60~80 年代, 由于捕捞强度的不断增大, 小黄鱼资源逐渐趋于衰退甚至枯竭。为保护和恢复小黄鱼渔业资源, 有关部门采取了产卵场全面禁渔及实施伏季休渔制度等一系列措施。进入 90 年代, 小黄鱼资源呈现恢复之势, 但其群体仍然表现出小型化、低龄化与性成熟加快等特征, 可见小黄鱼的基础还相当脆弱^[1]。

现代遗传学观点认为, 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, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件^[2]。因此, 研究物种的遗传结构和遗传分化, 揭示其遗传多样性水平, 是生物资源恢复和持续利用的前提和基础。目前有关小黄鱼的研究大多集中在渔业生物学方面, 涉及遗传多样性的研究尚不多。迄今有对采自黄海和东海 5 个海区小黄鱼的随机扩增 DNA 多态性(RAPD)分析报道^[3], 以及对包括小黄鱼在内的 5 种海水鱼同

工酶组织特性研究报道^[4]。作者应用 ISSR 分子标记技术对黄海南部小黄鱼的遗传多样性进行分析, 为详细了解该海域小黄鱼群体种质资源情况, 从而采取有效措施保护和维持现有种群资源及其合理利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本实验所用的小黄鱼样品, 为 2005 年 4 月采自黄海南部海域 121°35' E, 32°35' N 与 121°45' E, 32°25' N 两个捕捞作业区, 现场随机抽样, 冰贮运输, -20℃ 保存。样品个体均一, 质量 40 g 左右。

1.2 DNA 提取

基因组 DNA 提取采用 CTAB 法。取背部肌肉研磨, 加入 CTAB 提取液, 55℃ 水浴 1h, 酚氯仿去蛋

收稿日期: 2005-07-11; 修回日期: 2005-08-15

基金项目: 江苏省科技公益专项 (BM2004704)

作者简介: 许广平 (1980-), 女, 江苏南通人, 助研, 硕士, 主要从事海洋生物技术研究, E-mail: xgp80@sohu.com; 许璞, 通讯作者, 电话: 0513-5228265, E-mail: xupu66@sina.com

白,二倍体积的冰冻无水乙醇沉淀 DNA,70%乙醇洗涤,晾干,加 100 uL ddH₂O 溶解,1%琼脂糖电泳检测浓度,置于-20 保存。

1.3 PCR 扩增

实验所用 Buffer, dNTP, MgCl₂ 和 Taq DNA 聚合酶均购自上海生工。引物为加拿大 British Columbia 大学提供的成套引物。PCR 扩增在 T-Gradient Thermoblock 型 Biometra PCR 仪上进行。

PCR 反应总体积 25 μL,包括 10× PCR Buffer 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)2 μL, MgCl₂(2.5 mmol/L)2.5 μL, 模板 20 ng, 引物 0.3 μL 和 Taq 酶 1.0 U。

PCR 反应程序为 94 预变性 5 min,94 变性 1 min,52 退火 1 min,72 延伸 2 min,共 40 个循环,最后 72 延伸 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖电泳分离,经 EB 染色,在 FR-200 生物电泳图像分析仪上记录图谱。

1.4 数据分析

电泳图谱中的每一条带记为一个位点,只记录清晰可以辨别的。当某一扩增出现时记为 1,缺失则记为 0,从而建立原始谱带矩阵,并据此统计位点总数、多态位点数和多态位点比例。

群体的多态位点百分率:

$$p = \text{该群体的多态位点数} / \text{位点总数};$$

多态位点频率:

$$f = \text{具有该位点的样本数} / \text{总样本数};$$

Shannon 遗传多样性指数 $H_0 = -\sum_i p_i \ln p_i$, p_i 为某一条带在某一群体中出现的频率;

Shannon 遗传多样性值 $H = -\sum_i p_i \ln p_i / N$, N 为所测的座位数^[5]。

2 结果

2.1 个体多态性

在 100 个可供筛选的引物中,选出 10 个扩增效果清晰的用于分析(表 1)。共扩增出 64 条带,分子质量在 300~3 000 bp。平均每个引物扩增出了 6.4 条带,显示检测到位点较多,其中多态性条带 42 条,单一引物多态性片段比例(p)从 0.333 4~1.0,平均为 65.63%。从扩增图谱看,每个引物在群体的不同个体间都表现出很高的多态性。图 1 为引物 S835,S876 对所有个体扩增产物的电泳结果。

表 1 筛选出的引物序号、序列及其扩增结果

Tab.1 Codes and sequences of selected primers and amplification results

引物序号	碱基序列	总扩增 条带	多态性 条带	多态性比 例
S808	(AG) ₈ C	7	4	0.571 4
S809	(AG) ₈ G	8	3	0.375 0
S811	(GA) ₈ C	6	4	0.666 7
S824	(TC) ₈ G	3	2	0.666 7
S834	(AG) ₈ YT	3	2	0.666 7
S835	(AG) ₈ YC	6	2	0.333 4
S840	(GA) ₈ YT	7	7	1.000 0
S842	(GA) ₈ YG	4	3	0.750 0
S876	(GATA) ₈ (GACA) ₈	9	6	0.666 7
S881	(GGGT) ₃	11	9	0.818 2
总计		64	42	
平均多态位点比例				0.656 3

2.2 多态位点频率

根据多态性位点在样本中出现的几率计算多态性条带的基因频率(f),并以此计算群体的 Shannon 多样性值。在黄海南部小黄鱼群体中频率值的范围从 0.166 7~0.833 4,也表现出丰富的多样性(表 2)。

2.3 群体遗传多样性

在 ISSR 扩增中,该海域小黄鱼群体表现出丰富的遗传多样性。群内个体间的遗传相似性指数(I)从 0.666 7~0.876 4,平均 0.781 3,个体间平均遗传差异(D)为 0.218 7。根据多态位点频率计算出 Shannon 多样性指数(H_0)为 12.083 2,多样性值(H)0.188 8。与其他近海种类相比,各值均处在较高的水平。表 3 列出不同实验个体间的遗传相似性指数与遗传差异。

3 讨论

本研究采用 ISSR 技术对黄海南部小黄鱼群体进行遗传多样性分析,在 10 个扩增效果较好的引物中统计到 64 条带,具多态性的条带占 65.63%,群体内的遗传差异达 0.218 7,Shannon 多样性值为 0.188 8,表明小黄鱼具有丰富的遗传多样性。这与采用 RAPD 方法对小黄鱼群体研究得出的结果一致^[3]。在与其他近海鱼类的比较中,也可以看出小黄鱼种群的遗传多样性是较高的(表 4)。比较结果显示,同一

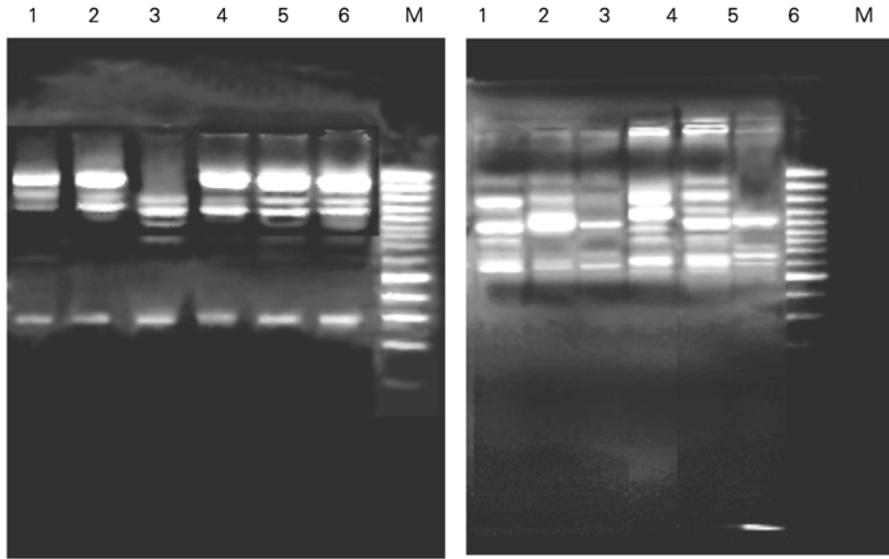


图1 引物 S835 和 S876 对小黄鱼 6 个样本的扩增结果

Fig.1 Amplification of genomic DNA from six samples of *P. polyactis* with primers S835 and S876
M 为 GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus ; 1-6 为实验样本

表 2 多态位点频率

Tab.2 Frequencies of the polymorphic loci					
位点	<i>f</i>	位点	<i>f</i>	位点	<i>f</i>
808-3	5/6	834-3	5/6	842-4	2/6
808-5	2/6	840-1	1/6	842-8	3/6
808-6	5/6	840-2	3/6	842-9	2/6
808-7	4/6	840-3	1/6	876-1	4/6
809-1	5/6	840-4	1/6	876-2	1/6
809-2	5/6	840-5	2/6	876-3	4/6
809-3	4/6	840-6	3/6	876-4	2/6
811-1	4/6	840-7	3/6	876-6	3/6
811-2	5/6	881-1	1/6	876-7	3/6
811-3	4/6	881-2	4/6	876-8	3/6
811-6	1/6	881-4	2/6	876-9	5/6
824-1	3/6	842-1	3/6	876-11	2/6
824-3	2/6	842-2	3/6	835-1	5/6
834-2	2/6	842-3	4/6	875-2	5/6

种群中野生群体的遗传多样性常高于养殖群体，这多是由于人工养殖的生态环境单一和近亲繁殖机率高等因素，造成了基因流失、性状退化和遗传多样性降低。而小黄鱼现仍为野生群体，目前尚无人工养殖或增殖放流史，因而避免了瓶颈效应、遗传漂变和近亲交配等因素对群体遗传多样性的不利影响。

本研究中所用 ISSR 方法是上世纪 90 年代由 Zietkiewicz 建立的基于 SSR 基础上的一种分子标记手段^[12]，主要应用于植物的种群鉴别、系统发生以及遗传多样性的研究，已有报道的主要有谷类、蔬菜、豆类、树木等植物^[13-16]，在鱼类中的研究报道较少^[17]。有研究认为 ISSR 比 RAPD 在扩增多态性与稳定性上更具优点^[18, 19]，但两种方法在结论上是一致的^[20]，本研究证实了这一观点。我们选用的 10 个引物 100% 为多态引物，其条带的多态率达到了 65.63%，平行实验扩增出同样的谱带。因此，将 ISSR 技术引入海水鱼的种质资源研究中是完全可行的，为深入了解鱼类种群的遗传背景提供了又一途径。

表 3 小黄鱼群体内的遗传相似性指数 *I* (对角线上方) 和遗传差异 *D* (对角线下方)

Tab.3 pairwise similarity coefficient(above diagonal)and genetic difference(below diagonal)of *P. polyactis*

样本编号	1	2	3	4	5	6
1	—	0.203 0	0.303 4	0.240 5	0.195 4	0.186 0
2	0.797 0	—	0.186 8	0.234 6	0.191 0	0.204 6
3	0.696 6	0.813 2	—	0.333 3	0.217 4	0.230 8
4	0.759 5	0.765 4	0.666 7	—	0.219 5	0.209 9
5	0.804 6	0.809 0	0.782 6	0.780 5	—	0.123 6
6	0.814 0	0.795 4	0.769 2	0.790 1	0.876 4	—

表 4 不同海水鱼类遗传多样性研究结果比较

Tab.4 Comparison of the genetic diversity in different major fishes

种类	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	<i>D</i>	<i>H</i>	研究方法	文献
网箱养殖大黄鱼	16.81	0.907 3	0.092 7	0.053 2	RAPD	[6]
真鲷青岛野生群体	81.48	0.865 0	0.135 0		RAPD	[7]
真鲷厦门野生群体	81.48	0.894 4	0.105 6		RAPD	[7]
真鲷海南野生群体	81.48	0.884 9	0.115 1		RAPD	[7]
大弹涂鱼	21.00	0.964 5	0.035 5	0.059 4	RAPD	[8]
养殖梭鱼	93.93			0.212 4	RAPD	[9]
野生梭鱼	85.71			0.227 1	RAPD	[9]
福建黄鳍鲷	44.09	0.882 1	0.117 9		RAPD	[10]
珠江黄鳍鲷	44.09	0.878 5	0.121 5		RAPD	[10]
宫井洋野生大黄鱼	18.90	0.9040	0.096 0		RAPD	[11]
宫井洋养殖大黄鱼	16.70	0.9250	0.074 7		RAPD	[11]
小黄鱼	65.63	0.781 3	0.218 7	0.188 8	ISSR	本文

黄海南部的吕泗渔场是重要的小黄鱼产区,曾存在我国沿海最大的小黄鱼群体。这一海域又是黄海小黄鱼的主要产卵场,每年春季有大量繁殖群体进入,种群数量达到高值,以及生殖洄游中发生的基因交流,应是该海域小黄鱼遗传多样性较高的主要原因。过度捕捞是影响群体遗传多样性主要因素。为了保护小黄鱼群体的自然遗传资源,维持其丰富的多样性,控制捕捞强度、划定禁渔区和禁渔期、加强海洋环境的监测与治理等,都是必需且有效的措施。同时更多开展对小黄鱼种质资源的研究,在较深层次上了解和把握种质资源动态,将为小黄鱼资源的恢复和合理利用提供依据。

参考文献:

[1] 林龙山,凌建忠,程家驹,等.小黄鱼资源状况及合理利用意见[J].海洋渔业,2000,3: 120-122.

[2] 蒙子宁,庄志猛,金显仕,等.黄海带鱼、小带鱼 RAPD 和线粒体 16SrRNA 基因序列变异分析[J].自然科学进展,2003,13(11):1 170-1 176.

[3] 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.

[4] 王可玲. 5 种海水鱼同工酶表达的组织特性及其电泳的初步分析[J].海洋与湖沼,1996,27(6): 626-631.

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

[6] 李明云,张海琪,薛良义,等.网箱养殖大黄鱼遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(6): 523-525.

[7] 江世贵,杨慧荣,苏天凤,等.3 个不同地理群体真鲷遗传变异的 RAPD 分析[J].水产学报,2004,28(3): 334-338.

[8] 金春华,钟爱华,黄福勇,等.大弹涂鱼自然种群遗传多样性

- 的 RAPD 分析[J].海洋科学,2004,28(12): 26-30.
- [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 DNA(RAPD)分析[J].海洋学报,2001,22(5): 82-87.
- [10] 杨慧荣,江世贵,苏天凤,等.黄鳍鲷两个自然群体遗传变异的 RAPD 分析[J].热带海洋学报,2004,23(2):55-61.
- [11] 王军,全成干,苏永全.宫井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J].海洋学报,2001,23(3):89-93.
- [12] Zietkiewicz E,Rafalski A, Labuda D.Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored potymerase chain reaction amplification[J].*Genomics*,1994,20:176-183.
- [13] Shuguang Jian,Tian Tang,Yang Zhong,*et al.*Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (*Sterculiaceae*) from China and Australia[J]. *Aquatic Botany*, 2004, **79**(1): 75-86.
- [14] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L) [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **5**(98):780-792.
- [15] Ajibade S R, Weeden N F, Chite S M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*[J]. *Euphytica*, 2000,111:47-55.
- [16] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J].*TAG Theoretical and Applied Genetics*,1997,3(95):408-417.
- [17] Mohamad H, Mireille H V , François B. Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003,**291** (2-3): 219-232.
- [18] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*,2001,**102**(2): 440 – 449.
- [19] Luís G, Teresa V, Carlos S,*et al.* Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.) [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*,2001, **48**(4): 329 – 338.
- [20] Mattioni C, Casasoli M, Gonzalez M, *et al.* Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species[J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2002 ,**14**(6-7): 1 064 – 1 070.

The research on genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* population from the southern part of the Yellow Sea

XU Guang-ping ,ZHONG Xia-ming ,DING Ya-ping ,LIU Pei-ting ,TANG Jian-hua ,XU Pu

(Oceanographic and Fisheries Institute ,Natong 226007, China)

Received: Jul.,11,2005

Key word: *Pseudosciaena polyactis*; genetic diversity; Inter-simple sequence repeat amplification

Abstract: Inter-simple sequence repeat amplification method was used to investigate the genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* population from the southern part of the Yellow Sea. Amplifications with 10 ISSR primers selected from 99 primers generated 64 reproducible and stable bands ,ranging from 300 ~ 3 000 bp,42 of which were polymorphic,and percentage of polymorphic loci was 65.63%.The genetic similarity index among individuals was 0.781 3 on average ,ranging from 0.666 7 ~ 0.876 4.Genetic distance is 0.218 7 on average .Shannon Weveis index of phenotypic diversity and Shannon Weveis value of phenotypic diversity were 12.083 2 and 0.188 8 respectively. The results indicated that the genetic diversity of *P. polyactis* was high .In the further production many effective husbandry and management measures must be taken to keep the genetic diversity so as to enable to obtain the sustainable development of the mariculture. (本文编辑 : 刘珊珊)