

斜带髯鲷养殖群体遗传多样性 RAPD 分析

梁君荣¹, 王军², 苏永全², 孙雄²

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对广东饶平海水网箱养殖的斜带髯鲷 (*Hapalogenys nitens* Richardson) 人工苗养殖群体 DNA 多样性进行检测。首先从 40 个引物 (S461~ S480, S501~ S520) 中快速筛选出 32 个引物, 它们均能扩增出清晰稳定的 DNA 片段。再将该 32 个引物对 46 尾斜带髯鲷进行 RAPD 分析, 共检测到 177 个位点, 其中多态位点 55 个 (分别由 18 个引物获得), 占 31.07%。由此得出该群体的平均多态性为 31.07%, 平均遗传差异度为 0.089, 表明该养殖群体遗传多样性水平较高。

关键词: 斜带髯鲷 (*Hapalogenys nitens* Richardson); 遗传多样性; 随机扩增多态性 DNA (RAPD)

中图分类号: Q953; Q523 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)12-0047-04

斜带髯鲷 (*Hapalogenys nitens* Richardson) 隶属于石鲈科, 髯鲷属, 是我国南方 20 世纪 90 年代初发展起来的名优海水养殖鱼类^[1-4]。由于其肉质鲜美, 富含营养, 生长快, 成鱼价格昂贵 (最高价达 130 元/kg 左右), 经济效益十分诱人, 因而迅速地在各地网箱养殖区推广开来。仅福建省, 1999 年, 斜带髯鲷年产量已达数百万尾^[5]。但在人工养殖的条件下, 原、良种鱼类会发生遗传变异, 使种质退化或混杂。特别是在人工育苗过程中, 常可能因亲本数太少, 产生遗传瓶颈效应而造成养殖群体的总变异减少。另一方面, 最大限度地维护斜带髯鲷养殖群体的遗传多样性是斜带髯鲷养殖业可持续发展的前提。因此, 很有必要尽快对现行养殖的斜带髯鲷的遗传本底进行检测和调查。该检测结果将能更好地指导斜带髯鲷的养殖业的发展, 并可为今后构建斜带髯鲷优良种质资源库提供理论依据。

目前群体遗传变异水平的检测有形态学方法、细胞学方法、同工酶电泳和 DNA 分子标记技术等多种方法。事实上, 任何一种检测方法都存在各自的优点和局限, 都能从各自的角度提供有价值的信息, 但却难以相互取代。本课题组已采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对取自广东饶平海水网箱养殖斜带髯鲷人工苗养殖群体 46 个样品同工酶的多态性进行了分析^[6], 在所检测的 11 种同工酶中有 3 种同工酶表现出多态性, 平均多态位点比例为 17.39%。为了更全面地了解该养殖群体的种质资源状况, 作者将进一步采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对该 46 个样本进行 DNA 水平的遗传多样性检测。

1 材料与 方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

斜带髯鲷 (1 龄鱼) 46 尾均为人工苗养殖鱼, 2001 年 1 月取自广东柘林湾海水养殖网箱, 平均体长为 17.6 cm (15.4~19.6 cm), 平均质量为 278 g (170~310 g)。

1.1.2 DNA 取样

取斜带髯鲷背部肌肉, 固定于 95% 的乙醇, 至 -20℃ 冰箱保存, 以备提取 DNA。

1.1.3 RAPD 反应引物

实验所用的系列随机引物为 S461~ S480, S501~ S520, 购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

参照《分子克隆实验指南》^[7] 方法, 从肌肉样品中提取基因组 DNA。

1.2.2 RAPD 反应

RAPD 反应在 PE9700 型 PCR 仪上进行, 反应体系 (25 mm³) 中包括: 无菌 DDW 16.5 mm³, 10× 不

收稿日期: 2004-11-24; 修回日期: 2004-06-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070595); 福建省自然科学基金资助项目 (B80010003)

作者简介: 梁君荣 (1975), 女, 福建长汀人, 博士, 讲师,

E-mail: sunljr@163.com; 王军, 通讯作者, 女, 教授,

电话: 0592-2182501, E-mail: Junw@xmu.edu.cn

含 Mg^{2+} 的 PCR 缓冲液 2.5 mm^3 , 2.5 mmol dNTP 1 mm^3 , 5 U/mm^3 Taq 酶 0.25 mm^3 , Mg^{2+} (25 mmol) 2.0 mm^3 , DNA 样品 (12.5 g/m^3) 2 mm^3 , 和 Prime (12.25 g/m^3) 1.25 mm^3 。测定循环条件为: 94°C , 2 min (93°C , 1 min 36°C , 1 min 72°C , 2 min) $\times 45$ 个循环 72°C 10 min 。RAPD 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。

1.2.3 数据处理

采用 RAPDistance Package-Version 1.04 软件分析。

个体间的遗传相似系数 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中: N_x 和 N_y 分别为两个个体 x 和 y 拥有的 RAPD 标记数; N_{xy} 为个体 x 和 y 共享的 RAPD 标记数。

多态位点比例 $P = (\text{群体的多态位点数} / \text{位点总$

数) $\times 100\%$;

遗传差异度 = $1 - \text{遗传相似系数}$ 。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

对斜带髯鲷养殖群体进行 40 个 RAPD 引物的快速筛选, 从中获得 32 个引物, 它们均能扩增出清晰稳定并可重复的 DNA 图谱。随后采用筛选出的 32 个引物分别对 46 尾斜带髯鲷基因组 DNA 进行 RAPD 检测, 共扩增出 177 条 DNA 片段, 其中单个引物获得的扩增产物为 1~11 个, 平均每个引物扩增的片段数为 5.53 个, 大小在 260~5200 bp 之间。部分引物的扩增图谱如图 1 所示。

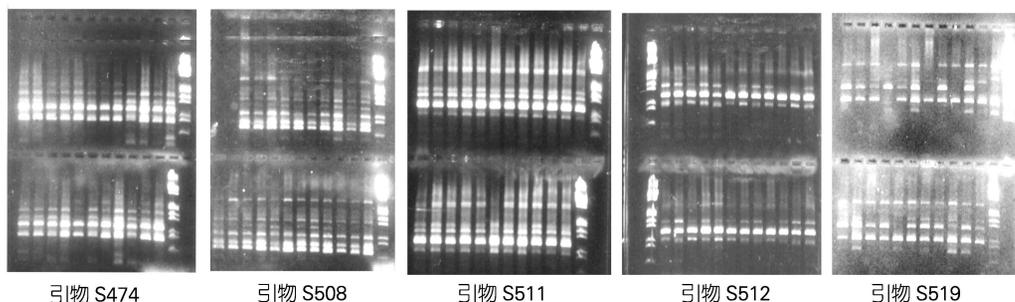


图 1 部分引物对部分斜带髯鲷基因组样品的扩增结果

Fig. 1 Amplification of genomic DNA of *Haploerythrin nitens* analyzed by RAPD
M: λ -DNA/*EcoR* + *Hind* ; Primers: S474, S508, S511, S512, S519

2.2 斜带髯鲷养殖群体 DNA 多样性

在所检测的 177 个位点中, 多态位点 55 个, 分别由 18 个引物获得, 各多态位点的基因频率列于表 1。由软件分析获得斜带髯鲷养殖群体的遗传相似系数为 0.847~0.963, 平均为 0.911, 平均遗传差异度为 0.089, 多态位点比例为 31.07%。

3 讨论

物种的变异首先发生在 DNA 水平上, 然后才反映到蛋白质和形态学特征上。当发生在 DNA 水平上的变异没有在蛋白质或形态学水平上表达时, 该变异就无法通过蛋白质或形态学特征检测出来, 这样从蛋白质或形态学水平上所揭示出的遗传变异水平就可能低于物种实际的变异水平。因此基于直接检测 DNA 水平的 RAPD 的检测结果较基于蛋白质水平的同工酶电泳结果更能真实地反映斜带髯鲷养殖群体的遗传变异水平。因此, 本文中, 由 RAPD 检

出的多态位点比例(31.07%) (高于文献[6]同工酶电泳的检测结果(17.39%)) 更真实地体现出了该养殖群体的遗传多样性水平。

斜带髯鲷作为我国南方名优海水养殖品种, 它的遗传多样性水平要高于其它一些养殖经济品种如大黄鱼^[8] (野生品种和养殖品种的多态位点比例分别为 18.9% 与 16.9%) 和一般脊椎动物的多态位点比例平均值 24.7%, 表明该人工苗养殖群体仍具有较丰富的遗传变异水平, 这也与它们的一些优良养殖性状相对应的。但是在养殖群体中, 近亲多代繁殖导致优良经济性性状衰退, 在海水鱼类人工繁殖中已普遍存在。因此, 为了最大限度地维护斜带髯鲷种内遗传多样性, 保证资源的可持续利用, 在进行斜带髯鲷人工繁殖和育苗时, 仍须十分重视养殖群体的遗传保护。其中, 选择足够数量的优良性状亲鱼是至关重要的, 最好能构建斜带髯鲷原种基地或遗传多样性高水平的种质资源库, 使优质种苗的供应得以保证。

表 1 RAPD 检测所得的多态位点频率

Tab. 1 The frequency of the polymorphic loci detected by RAPD

多态位点	多态位点频率	多态位点	多态位点频率
470- 1	0. 96	510- 5	0. 04
470- 2	0. 17	510- 6	0. 04
470- 4	0. 96	510- 8	0. 13
470- 5	0. 94	511- 1	0. 96
470- 6	0. 09	511- 2	0. 96
472- 1	0. 96	512- 2	0. 83
472- 2	0. 11	513- 1	0. 04
474- 3	0. 87	514- 3	0. 98
474- 6	0. 15	517- 2	0. 83
474- 7	0. 15	517- 3	0. 96
475- 2	0. 13	517- 4	0. 87
475- 8	0. 83	517- 5	0. 09
475- 9	0. 83	517- 6	0. 17
476- 5	0. 09	517- 8	0. 26
477- 1	0. 09	517- 9	0. 26
479- 2	0. 02	519- 1	0. 96
501- 1	0. 96	519- 2	0. 09
501- 3	0. 96	519- 3	0. 33
501- 5	0. 87	519- 4	0. 80
507- 6	0. 04	519- 5	0. 09
508- 2	0. 04	519- 6	0. 93
508- 4	0. 46	519- 7	0. 52
508- 5	0. 02	520- 1	0. 11
508- 9	0. 02	520- 2	0. 11
510- 1	0. 96	520- 4	0. 63
510- 2	0. 96	520- 5	0. 52
510- 3	0. 96	520- 6	0. 50
510- 4	0. 13		

和一般 PCR 反应一样, 引物是 RAPD 反应的关键因素。朱玲和宋林生^[9]认为引物的 G+ C 含量高于 60% 对 RAPD 反应具有较好的作用(信号较强的带明显增加), 且引物的最后 4 个核苷酸具有较高的 G+ C 含量对 RAPD 的特异性有利。实验中, 作者所选用的 40 个引物的 G+ C 含量均为 60% 或 70%, 因此绝大部分的引物都可以获得令人满意的扩增片

断。但仍 8 个引物(分别为 S463, S465, S466, S468, S469, S471, S480 和 S518)未获得令人满意的扩增片段, 且这 8 个引物中有 4 个引物的最后 4 个核苷酸具 G+ C 含量, 达 75% ~ 100%。可见, 要获得理想的 RAPD 结果, 需要考虑的因素有很多, 不仅是引物的选择, 还包括诸如反应体系、反应条件等。

- 参考文献:
- [1] 《福建鱼类志》编写组. 福建鱼类志(下卷)[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1985. 196-198.
- [2] 陈楷亮, 郑端义. 斜带髭鲷人工育苗的体会[J]. 科学养鱼, 1999, 5: 18.
- [3] 喻子牛, 孔晓瑜, 徐文武, 等. 斜带髭鲷和横带髭鲷的核型[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(2): 175-180.
- [4] 张纹, 苏永全, 王军, 等. 5种常见养殖鱼类肌肉营养成分分析[J]. 海洋通报, 2001, 20(4): 26-31.
- [5] 张其永, 洪万树, 陈朴贤. 福建海水鱼类人工繁殖和育苗技术的现状与展望[J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 266-274.
- [6] 梁君荣, 王军, 苏永全, 等. 斜带髭鲷养殖群体遗传多样性的同工酶研究[J]. 台湾海峡, 2003, 22(1): 19-23.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 463-469.
- [8] 全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 38(4): 584-588.
- [9] 朱玲, 宋林生. 栉孔扇贝 RAPD 反应体系的优化[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2002, 17(3): 236-239.

RAPD analysis of genetic diversity in reared *Hapalogenys nitens* stock

LIANG Jun-rong¹, WANG Jun², SU Yong-quan², DING Shao-xiong²

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Feb. , 12, 2004

Key words: *Hapalogenys nitens*; RAPD; genetic diversity; random amplified polymorphic DNA(RAPD)

Abstract: Genetic diversity of DNA in reared *Hapalogenys nitens* stocks, which were collected from Zhe-lin Bay in Guangdong Province in Jun. 1999, was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in this paper. There were 177 gene loci detected from 32 primers, and fifty-five loci of them were polymorphic. So the polymorphism and the mean difference of the reared *H. nitens* stocks were 31.07% and 0.089 respectively. The results showed that the reared *H. nitens* population still retained richer genetic diversity.

(本文编辑: 刘珊珊)