

长兴岛刀鲚群体的遗传多样性分析

马春艳, 刘敏, 马凌波, 张凤英, 陈亚瞿

(农业部海洋与河口渔业重点开放实验室 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090)

摘要:用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对长兴岛刀鲚 (*Coilia ectenes*) 38 个个体的遗传多样性进行了检测, 从 40 个随机引物中筛选出 13 个对刀鲚的 DNA 进行扩增, 结果为: 13 个引物共检测到 112 条清晰且重复性好的条带, 分子质量在 200~2 000 bp 之间, 其中多态位点为 74 个占 66.07%; 群体的 Shannon 多样性指数为 0.316 4, Nei 基因多样性指数为 0.207 5, 结果表明中国刀鲚遗传多样性处于较高水平。刀鲚成熟年龄早, 对产卵条件要求不甚严格, 产卵率和孵化率都比较高, 具有较强的种群恢复能力; 另外, 由于长江中下游和湖泊刀鲚的捕食者和饵料竞争者的减少, 客观上为刀鲚提供了良好的繁殖和幼鱼索饵条件, 因此, 结合刀鲚自身的生物学特征及生活环境特点, 采取合理的保护和管理措施, 中国刀鲚资源有望得到恢复。

关键词:刀鲚 (*Coilia ectenes*); 遗传多样性; 随机扩增多态性 DNA

中图分类号: Q 347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 3096 (2007) 12-0009-04

刀鲚 (*Coilia ectenes*) 是一种过河口洄游性小型经济鱼类, 隶属于鲱形目、鲱科, 主要分布在中国黄渤海和东海一带, 长江、黄河、钱塘江以及其他通海河流中均有分布, 与鲥鱼、鲢鱼合称“长江三鲜”, 20 世纪 70 年代初, 仅刀鲚幼鱼每年捕捞量约 1 000 万 kg 左右, 刀鲚在长江中下游已成为优势种之一。但是从 70 年代中期开始, 由于大规模的无节制的捕捞, 刀鲚资源量下降, 成汛时间缩短。到 1997 年后已没有明显的鱼汛, 最高网获量也只有 1995 年的十分之一, 产量锐减^[1], 近几年, 长江口刀鲚资源再趋枯竭, 保护刀鲚资源刻不容缓。

迄今, 有关刀鲚的研究大多集中在渔业生物学及其生态学方面^[2-4], 涉及其遗传多样性的研究还未见报道。一些水产强国自 20 世纪 80 年代初就倡导渔业资源的开发和管理应赋予遗传多样性保护的内涵^[5], 作者采用随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术^[6, 7] 对长兴岛刀鲚的遗传多样性进行检测, 以期从 DNA 水平了解刀鲚资源遗传背景, 为刀鲚的合理利用和保护提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料来源

刀鲚样本于 2003 年 11 月捕自长兴岛附近水域, 所取 38 尾样本的体长为 210~275 mm, 质量为 30~

57 g, 样品于 -20℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备

基因组 DNA 的提取参照文献^[8] 的方法, 并略有改进。将获得的基因组 DNA 沉淀溶于适量 ddH₂O 中, 通过 Bio photometer proRNA/DNA 定量分析仪进行浓度测定。

1.2.2 RAPD 反应条件

本实验共对 40 条随机引物 (上海生工) 进行筛选, 选取在多次重复扩增中重复性好的 13 个引物用于 RAPD 分析。扩增反应在 PT C200 扩增仪上进行。反应总体积为 25 μL, 其中包括 10× PCR 反应缓冲液 2.5 μL; MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL; DNA 模板 (10 mg/L) 2 μL; Taq 酶 (上海生工, 5 U/μL) 0.2 μL; dNTP (各 2.5 mmol/L) 1 μL; RAPD 引物 (10 μmol/L) 1 μL; 用 ddH₂O 补足体积。PCR 反应在 PT G 200 扩

收稿日期: 2004 08 26; 修回日期: 2005 06 22

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (50339040); 长江口航道建设有限公司资助项目

作者简介: 马春艳 (1978), 女, 山东德州人, 研究实习员, 硕士, 主要从事鱼类分子遗传研究, 电话: 021-65688139, E-mail: mcy0527@yahoo.com.cn; 陈亚瞿, 通讯作者, 电话: 021-65680293, E-mail: yq_chen@citiz.net

增仪上进行, 94℃ 预变性 7 min 后进行 45 个循环, 每个循环包括 94℃ 1 min、37℃ 1 min、72℃ 2 min, 最后于 72℃ 再延伸 10 min。反应结束后 4℃ 保存, 每次反应设不含模板 DNA 的空白对照。

1.2.3 电泳检测

RAPD 产物用含有溴化乙锭的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 经凝胶成像系统观察记录。

1.2.4 数据分析

根据观察结果, 扩增条带有且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建原始数据表征矩阵, 并据此统计位点总数和多态位点比例, 分析和计算群体的遗传多样性参数。多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$; Shannon 多样性指数 $H = - \sum X_i \log_2 X_i / n$ (X_i 为第 i 条扩增条带存在的频率, n 为检测位点总数)^[9]; Nei 基因多样性指数 $H_e = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为单个位点上的等位基因的频率^[10]。

2 结果

根据扩增产物的一致性和重复性, 从 40 个(S101~S140) 10 bp 随机引物中选取 13 个对长江口刀鲚的遗传多样性进行分析, 每个引物扩增出 4(S139) ~ 12 (S122, S126) 条清晰可辨且重复性强的条带, 共计 112 条, 平均每个引物扩增出 8.6 条, 其中 74 条表现为多态, 多态条带比例为 66.07%, 各引物揭示遗传变异的能力不同, 每个引物均扩增出多态片段, 多态位点百分率(12.5% ~ 91.67%) 因引物而异, 利用 Shannon 多样性指数对 13 个引物所检测到的表型频率进行遗传多样性分析, 各引物检测到的多样性指数在 0.205 9~ 0.535 8 之间(表 1), 群体总的多样性指数为 0.316 4, Nei 基因多样性指数为 0.217 5。图 1 列出了引物 S116 对长兴岛刀鲚群体的扩增电泳图谱。

表 1 选取的 13 个引物的扩增结果

Tab. 1 Amplification results of the 13 arbitrary primers used in the study

引物	引物序列(5' - 3')	位点总数	多态位点数	多态位点百分率(%)	多样性指数
S105	AGTCGTCCAC	6	5	83.33	0.407 4
S111	CTTCCGCAGT	11	8	72.73	0.379 6
S112	ACGCGCATGT	8	1	12.5	0.460 3
S114	ACCAGGTTGG	10	6	60	0.205 9
S115	AATGGCGCAG	10	5	50	0.255 6
S116	TCTCAGCTGG	6	4	66.67	0.417 1
S122	GAGGATCCCT	12	9	75	0.324 6
S123	CCTGATCACC	8	4	50	0.245 4
S126	GGGAATTCGG	12	11	91.67	0.437 1
S132	ACGGTACCAG	10	7	70	0.322 4
S135	CCAGTACTCC	8	7	87.75	0.535 8
S139	CCTCTAGACC	4	2	50	0.401 3
S140	GGTCTAGAGG	7	5	71.43	0.260 7
总计		112	74	66.07	0.316 4

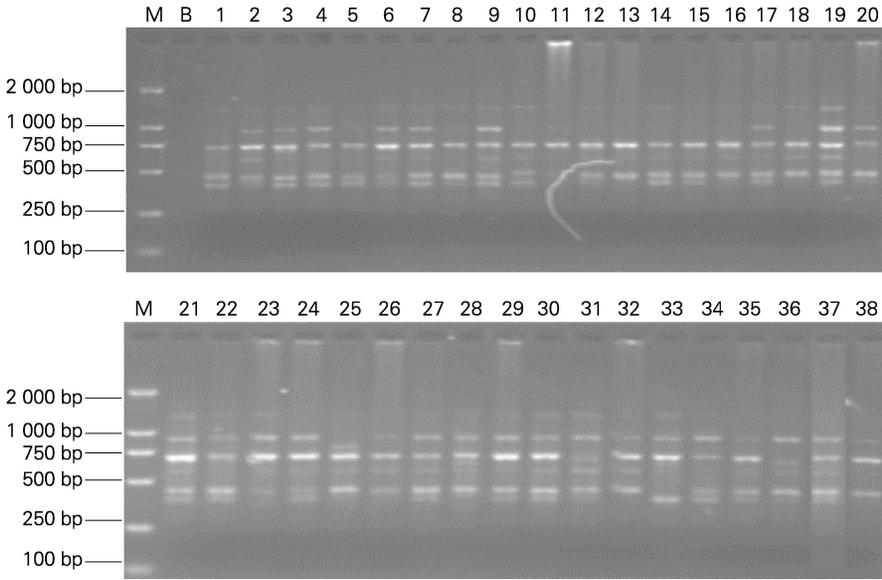


图 1 引物 S116 对刀鲚基因组的 RAPD 扩增电泳图谱

Fig. 1 Amplification of genomic DNA of *Coilia ectenes* with primer S116

M: DL-2000 标准分子质量; B: 阴性对照

M: DL-2000 molecular weight marker; B: Negative control

3 讨论

王军等^[11]对取自宁德官井洋闽粤东族大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 进行分析,发现大黄鱼野生和养殖群体多态比例分别为 18.9% 和 16.7%, 均比脊椎动物的平均值(24.7%) 要低,表明大黄鱼遗传多样性水平低的原因在于过度捕捞、有效繁育群体数量偏少及人工放流等。尤锋^[12]对牙鲆遗传多样性进行研究, RAPD 所揭示的自然群体和养殖群体的多态位点百分率分别为 43.2% 和 34.9%, 结果表明自然群体的多态位点比例和平均杂合度要比养殖群体的数值高, 养殖群体的遗传多样性水平已经有明显的丧失并对自然群体的基因库产生负面的影响。孟宪红等^[13]对真鲷 (*Pagrus major*) 自然群体和人工繁育群体的遗传多样性进行了 RAPD 分析, 结果表明: 两群体的多态片段比例分别为 62.60% 和 54.47%, 养殖群体遗传多样性低于自然群体。丁少雄等^[14]利用 RAPD 技术检测到鮟蛸黄姑鱼 (*Nibea miichthioides*) 野生和养殖群体的多态位点比例分别为 16.5% 和 15.7%, 两群体的遗传多样性都比较贫乏, 说明多年来鮟蛸黄姑鱼野生种群数量的锐减已对台湾海峡鮟蛸黄姑鱼种质基因库造成严重的影响, 许多稀有的等位基因位点都已经消失。本研究采用 13 个随机引物共检测到 112 个位点, 其中 74 个表现为多态, 多态位点比例为 66.07%, 比 RAPD 检测的鮟蛸黄姑鱼、大黄鱼、牙鲆等的都要高。究其原因, 除了物种自身

的差异外, 可能是刀鲚迄今尚未进行人工养殖和种苗放流增殖, 从而避免了影响群体遗传多样性的瓶颈效应、遗传漂变和近亲杂交等因素^[6, 15] 的影响。

从遗传多样性角度来讲, 一个物种遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关, 遗传多样性的降低可导致其适应能力降低, 有害隐性基因表达增加及经济性性状衰退, 最终导致物种退化。丰富的遗传多样性则意味着比较高的适应生存能力, 蕴涵着比较大的进化潜力以及比较丰富的育种和遗传改良能力。从本实验结果看, 刀鲚群体多态位点比例为 66.07%, Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数分别为 0.316 4 和 0.217 5, 说明尽管中国刀鲚因过度捕捞和大量捕杀幼鱼而使资源严重衰退, 但其遗传多样性仍处于较高水平; 其次, 刀鲚成熟年龄早, 对产卵条件要求不甚严格, 产卵率和孵化率都比较高, 具有较强的种群恢复能力; 另外, 由于长江中下游和湖泊刀鲚的捕食者和饵料竞争者的减少, 客观上为刀鲚提供了良好的繁殖和幼鱼索饵条件。因此, 只要采取合理的保护措施(如合理捕捞、保护亲鱼及其产卵场、保护刀鲚鱼苗和幼鱼等), 中国刀鲚资源有望得到恢复。

RAPD 技术继承了 PCR 的优点, 同 RFLP、DNA 指纹图谱法等其他 DNA 多态性技术相比, RAPD 具有检测效率高、样品用量少、灵敏度高和检测容易等特点和优势, 然而 RAPD 位点是显性的, 仅根据 RAPD 进行的等位基因频率估算可能会高估种群间

的遗传分化^[16], 因此, 应采用其他分子标记技术对刀鲚的遗传多样性进一步进行评估, 与 RAPD 分析结果相互比较以对其种质资源状况有一个整体而准确的了解。

参考文献:

- [1] 高成洪. 长江刀鱼资源亟待保护[J]. 中国水产, 2000, 3: 16-17.
- [2] 袁传宓, 秦安林. 我国近海鲚鱼生态习性及其产量变动状况[J]. 海洋科学, 1984, 5: 35-37.
- [3] 黄晋彪, 张雪生. 长江口鲚资源试析[J]. 水产科技情报, 1989, 16(6): 173-175.
- [4] 朱栋良. 长江刀鱼的天然繁殖与胚胎发育观察[J]. 水产科技情报, 1992, 19(2): 49-51.
- [5] Ryman N, Utter F. Population Genetics and Fisheries Management [M]. Seattle: University of Washington Press, 1987.
- [6] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 7 213-7 218.
- [7] Williams J K G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6 531-6 535.
- [8] 萨姆布鲁克, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实

验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1999. 463-469.

- [9] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I. Detection of genetic variation between and within population of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers [J]. *Heredity*, 1992, 69: 465-472.
- [10] Nei M. The theory of genetic distances and evolution of human races [J]. *Journal of Human Genetics*, 1978, 23(4): 341-369.
- [11] 王军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2001, 23(3): 87-91.
- [12] 尤锋. 牙鲆群体遗传多样性及鲽形目鱼类分子系统学初步研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2001.
- [13] 孟宪红, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 248-252.
- [14] 丁少雄, 苏永全, 王军, 等. 闽粤沿海鳗状黄姑鱼野生种群和人工繁育群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2003, 27(8): 63-66.
- [15] Kirsten W, Jenny P V. Rapid detection of genetic variability in *Chrysanthemum* using random primers [J]. *Heredity*, 1993, 71: 335-341.
- [16] Isabe I N, Beaulieu J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotype data at enzyme and RAPD loci in black spruce [J]. *Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6 369-6 373.

Application of random amplified polymorphic DNA marker to evaluating the genetic diversity of *Coilia ectenes* of Changxing Island

MA Chur-yan, LIU Min, MA Ling-bo, ZHANG Feng-ying, CHEN Ya-qu

(Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resource Certificated by Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Received: Aug., 26, 2004

Key words: *Coilia ectenes*; genetic diversity; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Abstract: The random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to estimate genetic diversity of *Coilia ectenes* caught in Changxing Island. Using 13 decamer random primers, 112 clear and reproducible RAPD sites were detected in total of 38 individuals. Among the 112 sites, 74(66.07%) of them was polymorphic and their molecular weight varied from 200 to 2 500 base pairs. Genetic diversity quantified by Shannon Index varied from 0.205 9 to 0.535 8 with an average of 0.316 4. The index of Nei's gene diversity was 0.207 5. Results of RAPD analysis suggested that the genetic diversity of *C. ectenes* was in a much higher state. *C. ectenes* had the characteristics of early maturity, low demand for spawning conditions, high rates of spawning and hatching. At the same time, the hunters and competitor of *C. ectenes* were decreasing in the middle and lower reaches of the Changjiang River and lakes, which supplied an upstanding condition for *C. ectenes* to reproduce and search food. Combining the biological characteristics and its habitation of *C. ectenes* with reasonable measure to protect and manage *C. ectenes*, its resource quantity would be recovered.

(本文编辑: 刘珊珊)