

# 闽粤沿海鲩状黄姑鱼野生种群和人工繁育群体遗传多样性的 RAPD 分析<sup>\*</sup>

丁少雄<sup>1,2</sup> 苏永全<sup>1</sup> 王 军<sup>1</sup> 全成干<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学海洋学系 厦门 361005)

(<sup>2</sup>厦门大学生物系 厦门 361005)

**摘要** 采用 RAPD 技术对鲩状黄姑鱼 (*Nibea miichthioides*) 野生种群及人工繁育群体进行了 DNA 多态性检测。共采用 40 个随机引物进行扩增,其中 35 个引物在野生种群和人工繁育群体中都扩增出 230 个 RAPD 位点。野生种群和人工繁育群体的多态位点比率  $P$  分别为 16.5% 和 15.7%; 群体相似系数  $S$  为 0.954 和 0.967; Shannon 信息指数  $H_0$  为 0.113 和 0.104; 基因多样性指数  $H$  为 0.085 和 0.083; 而两群体间的遗传距离  $D$  为 0.022。所得结果表明两群体间具有非常相近的亲缘关系,且遗传多样性水平都比较贫乏。

**关键词** 鲩状黄姑鱼 (*Nibea miichthioides*), 多态性, RAPD

**中图分类号** Q347 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)08-0063-04

鲩状黄姑鱼 (*Nibea miichthioides* (Chu, lo et Wu)) 俗称鲩鲈(福建)、青鲈(广东), 主要分布在我国东海南南部和南海<sup>[1]</sup>, 属近岸暖水性中下层大型食用鱼类, 大者体长可达 1.5 m, 质量 30 kg。20 世纪 80 年代, 闽、浙、粤渔民开始捕捞鲩状黄姑鱼野生苗进行网箱

---

\* 国家自然科学基金资助项目 39870562 号。

第一作者: 丁少雄, 出生于 1973 年, 厦门大学生物系博士后, 讲师, 研究方向: 海水鱼类种质与遗传育种。E-mail: sxding@yanan.xmu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-04; 修回日期: 2003-06-16

养殖。由于无节制的滥捕,90年代后自然海区鮟状黄姑鱼资源量急速下降。1992年人工育苗获得成功,解决了鮟状黄姑鱼网箱养殖的苗种来源,有效减轻了捕捞压力,近年来在南方沿海又可捕获到少量的野生鮟状黄姑鱼。

为了研究野生鮟状黄姑鱼的遗传背景,查明它们与人工繁育群体之间的亲缘关系,并探讨由于滥捕而导致的群体小型化对野生种群以及经过多年人工繁育对养殖群体遗传结构的影响,本文采用 RAPD 方法分别对鮟状黄姑鱼的野生与人工繁育群体的 DNA 多态性进行检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

本文所用人工苗养殖的鮟状黄姑鱼样本 30 尾,1997 年 11 月 21 日取自厦门火烧屿养殖网箱,平均体长 45.3 cm (48.4~41.2 cm),平均体质量 941.5 g (1 123.4~902.3 g),其亲本为 1992 年首次育苗成功的同批野生亲鱼。野生种群的鮟状黄姑鱼样本 30 尾,1999 年 11 月 10 日取自广东饶平柘林湾网箱,为当地渔民于闽、粤沿海海区捕捞所获并暂养于网箱,平均体长 47.5 cm (50.2~42.2 cm),平均体质量 1 013.2 g (1 198.5~934.6 g)。试验鱼均为 1 龄鱼。

### 1.2 随机引物

实验所用随机引物为 Operon 公司 V 系列及 P 系列产品共 40 个,其碱基序列如表 1 所示。

### 1.3 实验方法

群体检测所用的基因组 DNA 均从背鳍鳍条末端提取。DNA 提取及 RAPD 产物电泳检测法参照文献[2]。扩增反应在 PE9700 型 PCR 仪上进行。反应体积为 25  $\mu$ L,组分如下:10 $\times$  PCRbuffer 2.5  $\mu$ L, DNA 模板 25 ng,引物 200 pmol, 2.5 mmol/L dNTP1  $\mu$ L, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1.8  $\mu$ L, Taq 酶 1U(上海生工),无菌 ddw 补满 25  $\mu$ L。扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 2 min(93  $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 36  $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C 2 min) $\times$ 45cys $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C 5 min。

扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离, E. B 染色,紫外灯下观察,拍照。

### 1.4 数据分析

以相似系数  $S$  来表示群体内的遗传相似度,根据 Lynch<sup>[3]</sup>公式:  $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  计算,其中  $N_{xy}$  是个体  $x$  和个体  $y$  共有的条带数,  $N_x$  和  $N_y$  分别是个体  $x$  和个体  $y$  所扩增出的条带数。群体内的相似系数  $S$  为 1 个群体内所有个体间相似系数的平均值。多态性比率  $P$  表示出现多态性的位点占总检测位点的比

表 1 随机引物及碱基序列

Tab.1 Sequences and random primers used for RAPD

引物	序列	引物	序列
P-01	GTAGCACTCC	V-01	TGACGCATGC
P-02	TCGGCACGCA	V-02	AGTCACTCCC
P-03	CTGATACGCC	V-03	CTCCCTGCAA
P-04	GTGTCTCAGG	V-04	CCCCTCACGA
P-05	CCCCGGTAAC	V-05	TCCGAGAGGG
P-06	GTGGGCTGAC	V-06	ACGCCACGGT
P-07	GTCCATGCCA	V-07	GAAGCCAGCC
P-08	ACATCGCCCA	V-08	GGACGGCGTT
P-09	GTGGTCCGCA	V-09	TGTACCCGTC
P-10	TCCCGCCTAC	V-10	GGACCTGCTG
P-11	AACCGCTCCG	V-11	CTCGACAGAG
P-12	AAGGGCGAGT	V-12	ACCCCCACT
P-13	GGAGTGCCCTC	V-13	ACCCCTGAA
P-14	CCAGCCGAAC	V-14	AGATCCCCGC
P-15	GGAAGCCAAC	V-15	CAGTGCCGGT
P-16	CCAAGCTGCC	V-16	ACACCCACACA
P-17	TGACCCGCCT	V-17	ACCGGCTTGT
P-18	GGCTTGGCCT	V-18	AGGTGGCGTT
P-19	GGGAAGGACA	V-19	GGGTGTGCAC
P-20	GACCCTAGTC	V-20	CAGCATGGTC

率。

用 Shannon 信息指数<sup>[4]</sup>  $H_0$  来计算各群体的遗传多样性:  $H_0 = -\sum P_i \ln P_i / n$ , 其中  $P_i$  为第  $i$  个等位基因频率,  $n$  为检测位点总数。

Nei 基因多样性指数  $H$  也经常用于评估群体内及群体间的遗传变异水平<sup>[5]</sup>,  $H = 1 - \sum P_i^2$ ; 群体间遗传距离  $D_{ij} = -\ln(S_{ij} / \sqrt{S_i S_j})$ , 其中  $S_{ij}$  为两群体总的平均遗传相似系数,  $S_i$  和  $S_j$  分别为群体  $i$  和群体  $j$  的相似系数平均值<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

本实验共采用 40 个随机引物进行扩增, 其中 OPP-09, OPP-13, OPV-10, OPV-11, OPV-19 无产物或产物弥散无法分析, 其余 35 个引物均可获得清晰且重复性好的扩增图谱(图 1), 在野生种群和人工繁育群体中都扩增出 230 个 RAPD 位点。其中有 25 个引物为多态扩增引物, 可扩增多态引物比例为 71.4%。在野生种群中有 38 个扩增位点具多态性(扩增片段出现频率小于 0.99), 在人工繁育群体中有 36 个。两群体共有的单态位点为 191 个, 共有的多态位点为 35 个, 未找到能区分两群体的特异性 DNA 扩增片段。

根据所得结果进行了几种不同方法的统计分析

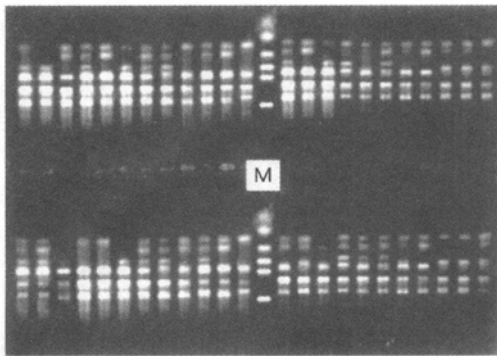


图1 引物 P-08 在野生(上)和人工繁育群体(下)中的扩增结果

Fig.1 The amplified pattern of wild (upper) and reared(below) *N. mitchthioides* group by primer P-08  
M: DNA marker DL 2000(TaKaLa CO.,Ltd)

(表2),野生种群和人工繁育群体的  $P$  分别为 16.5% 和 15.7%;  $S$  为 0.954 和 0.967;  $H_0$  为 0.113 和 0.104;  $H$  为 0.085 和 0.083; 而  $D$  为 0.022。所得结果均表明人工繁育群体的遗传变异水平稍低于野生种群,但两者差别不大。分析结果也表明了两群体内个体间及两群体间都不存在显著差异 ( $P > 0.05$ ),说明两群体间具有非常相近的亲缘关系。此外,由于两群体总的  $H_0$  为 0.121, 可以得出种群内遗传多样性所占比例为 87.5%, 种群间多样性所占比例为 12.5%。

表2 鮟状黄姑鱼野生种群和人工繁育群体 RAPD 标记分析的遗传多样性

Tab.2 Genetic variability from the analysis of RAPD markers in the wild population and breeding stock of *N. mitchthioides*

群体	$P(\%)$	$S$	$H_0$	$H$	$D$
野生种群	16.5	0.954	0.113	0.085	0.022
繁育群体	15.7	0.967	0.104	0.083	

### 3 讨论

作为一种有用的分子生物学分析技术, RAPD 能检测出较多的遗传变异。在本实验中,对野生和人工繁育群体的鮟状黄姑鱼, RAPD 所检测出的遗传变异度明显要超过同工酶<sup>[6]</sup>, 这与李思发等在淡水鲂属鱼

类及邹曙明等在海水的牙鲆和大菱鲆等鱼类上的研究结果是一致的<sup>[7,8]</sup>。由于同工酶标记并不是基因组的随机样本,其揭示的是编码蛋白质序列的变化,因而受到选择的约束。而作为中性位点来说, RAPD 标记则不受这些影响。然而与同工酶相比, RAPD 也是有局限性的,最主要一点就是 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分化<sup>[9]</sup>,因此在分析数据时,特别是在与其它检测手段所得结果进行比较时,对 RAPD 这种高估的可能性需要加以考虑和校正。

由于“瓶颈”效应,人工繁育对养殖群体的遗传多样性影响早已多有报道<sup>[10,11]</sup>。本实验中,无论是  $P$  和  $S$ , 还是  $H_0$  或  $H$ , 不同的统计分析方法所揭示的两群体的遗传多样性变化趋势都基本一致,也即人工繁育群体的遗传多样性水平要略低于野生种群。而与其他鱼类相比较<sup>[7,8,12]</sup>, 鮟状黄姑鱼野生与养殖群体的遗传多样性都是比较贫乏的,说明多年来鮟状黄姑鱼野生种群数量的锐减已对台湾海峡鮟状黄姑鱼的种质基因库造成严重影响,许多稀有的等位基因位点都已消失。通过人工繁育群体和野生种群多样性指数及遗传距离的比较,特别是对遗传距离进行  $t$  检验的结果表明人工繁育群体和野生种群差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 而由  $H_0$  的估算也显示出鮟状黄姑鱼 87.5% 遗传变异为种群内变异,只有 12.5% 的变异为种群间变异;此外,在两群体中未能找到各自特有的基因位点,这些都说明两群体间有非常相近的亲缘关系,有可能来源于同一野生种群。

虽然本实验结果表明无论是养殖还是野生鮟状黄姑鱼群体的遗传多样性都处于较低水平,但是从目前养殖状况来看,养殖群体尚未出现很明显的经济性性状衰退现象。因此,切实加强对现有资源的科学管理和保护,特别注意避免人工育苗中有效繁育群体过小等易于引起种质资源衰退的繁育方式,鮟状黄姑鱼资源的持续利用将成为可能。

#### 参考文献

- 1 张其永,洪万树. 福建沿海网箱养殖鮟状黄姑鱼的鉴别. 福建水产,1997, 2:6-8
- 2 丁少雄,王军,全成干,等. 鮟状黄姑鱼养殖群体的遗传多样性. 科学通报,1998,43(1):2 294-2 298
- 3 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. Molbiol Evo,1990,7:478-484
- 4 Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium*

- and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 1992, 69: 465-472
- 5 Nei M. The theory of genetic distances and evolution of human races. *Journal of Human Genetics*, 1978, 23(4): 341-369
  - 6 丁少雄, 王军, 全成干, 等. 野生与养殖鮠状黄姑鱼群体多样性的同工酶比较研究. *厦门大学学报*, 2001, 40(4): 922-926
  - 7 李思发, 朱泽闻, 邹曙明, 等. 鲂属团头鲂、三角鲂及广东鲂种间遗传关系及种内遗传差异. *动物学报*, 2002, 48(3): 339-345
  - 8 邹曙明, 李思发, 蔡完其. 牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 6-9
  - 9 Isabe I N, Beaulieu J. Complete congruence between genetic diversity estimates derived from genotype data at enzyme and RAPD loci in black spruce. *Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6 369-6 373
  - 10 Maria E D, Dadiel C. Genetic diversity of population of the fresh water shrimp *Macrobrachium borellii* evaluated by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology*, 1996, 16(4): 578-588
  - 11 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的 RAPD 标记研究. *海洋与湖沼*, 1999, 30(3): 261-265
  - 12 Cagigas M E, Vazquez E, Blanco G. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites and RAPD markers. *Marine Biotechnology*, 1999, 1 (3): 286-296

## GENETIC DIVERSITY OF NATURE AND REARED GROUP OF *Nibea mitchthioides* BY RAPD ANALYSIS

DING Shao-Xiong<sup>1,2</sup> SU Yong-Quan<sup>1</sup> WANG Jun<sup>1</sup> QUAN Cheng-Gan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005)

(<sup>2</sup>Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Received:** Apr., 4, 2003

**Key Words:** *Nibea mitchthioides*, Genetic diversity, RAPD

### Abstract

The genetic diversity between wild population and reared group of *Nibea mitchthioides* was investigated by RAPD analysis in present study. 35 decamer random primers screened from 40 Operon's primer series were used to amplify RAPD fragments using a standard RAPD protocol. Total 230 DNA loci were detected in the two groups. The results showed that: (1) The ratio of polymorphic loci ( $P$ ) and genetic similarity ( $S$ ) of the wild and reared group of *Nibea mitchthioides* were 16.5%、0.954 and 15.7%、0.967 respectively; (2) The Shannon's information index ( $H_0$ ) and Nei's index were 0.113, 0.085 and 0.104, 0.083 for the two groups separately; (3) The genetic distance between the groups was 0.022. It indicated that the wild population of *Nibea mitchthioides* had a close relationship with the reared group, and both of them possess of low genetic variation levels.

(本文编辑: 刘珊珊)