

漠斑牙鲆养殖群体 RAPD 遗传多样性的初步分析

尤 锋¹, 吴志昊¹, 王 伟^{1,2}, 徐冬冬¹, 许建和^{1,3}, 倪 静¹, 孙 威¹,
张培军¹, 徐永立¹, 杨学宋⁴, 孙寿科⁴

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003;
3. 淮海工学院, 江苏 连云港 222005; 4. 莱州大华水产有限公司, 山东 莱州 261418)

摘要: 利用 RAPD 技术对由美国引进的漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) 养殖子一代群体的遗传多样性进行了研究。实验用漠斑牙鲆鱼苗于 2004 年 10 月取自山东莱州大华水产有限公司, 共 24 尾, 全长平均为 16.6 mm ± 1.99 mm。活体取其肌肉, 用高盐法抽提获得总 DNA, 琼脂糖电泳检测, Beckman DU-6100 型紫外分光光度仪定量后用随机引物进行 PCR 扩增, 从 25 个随机引物中筛选出 11 个用于群体遗传学分析, 共获得 77 条清晰重复性高的 DNA 片段, 大小在 100~2 000 bp 之间, 多态谱带比例和群体平均杂合度分别为 66.23% 和 0.352 6。

关键词: 漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*); 养殖群体; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)02-0086-05

漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*) 隶属硬骨鱼纲 (Osteichthys)、鲽形目 (Pleuronctiformes)、牙鲆科 (Paralichthyidae)、牙鲆属 (*Paralichthys*), 又称南方牙鲆。该鱼原产于美国, 分布于美国大西洋沿岸佛罗里达州北部沿海和墨西哥湾沿海, 为底栖鱼类, 是美洲众多鲽鱼类中个体最大的一种^[1,2]。漠斑牙鲆肉质细嫩、鲜美, 在美国、日本、韩国倍受消费者青睐。而且该鱼具有食性杂、适盐广、生长快、抗病力强、较耐高温和易活运等特点, 属优良的养殖鱼类, 美国自 20 世纪 90 年代初开始研究漠斑牙鲆繁育及养殖技术, 在生理、生态、人工繁殖及养殖技术方面已取得突破, 并已成为美国迅速发展起来的一个新兴养殖产业^[3-5]。

漠斑牙鲆引入中国的时间较短 (在北方只有 2~3 a 的历史), 适合在中国北方、南方进行池塘、网箱和工厂化养殖, 该品种的引进, 为中国鱼类养殖又增添了一个新的优良品种, 其养殖前景十分广阔。在这种情况下, 开展漠斑牙鲆的遗传多样性研究就具有十分重要的意义, 其研究结果对于进行该物种的健康养殖、遗传改良、提高选育的效率和质量、构建连锁图谱等方面都将有十分重要的应用价值。但目前对于漠斑牙鲆的研究多局限在形态学、生理和养殖方面^[3,6-9], 其遗传多样性研究的正式报道只见到美国学者对美国海区自然群体的同工酶群体遗传分析^[10]。

RAPD 技术自 20 世纪 90 年代出现后已被广泛

地应用于遗传多样性、种群遗传变异、种群间的基因流动、种质资源研究、物种进化及品种鉴定、基因组图谱构建、亲缘关系分析、遗传育种、特定基因的标记、定位和分离等许多研究领域。也已经在许多鱼种上开展了相关的遗传多样性研究^[11,12]。

通过使用 RAPD 技术, 对引进漠斑牙鲆的养殖子一代 (F1) 的遗传多样性进行了初步研究。期望能够真实、全面地揭示漠斑牙鲆的遗传多样性, 为漠斑牙鲆人工养殖业健康和可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

漠斑牙鲆养殖群体样本于 2004 年 10 月取自山东莱州大华水产有限公司, 共 24 尾, 均为活体。每尾鱼经过形态学测量解剖取其肌肉后放入样本袋, 立即置于 -70℃ 保存至分析。所取样本平均全长为 16.60 mm ± 1.99 mm。

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2005-11-22

基金项目: 国家高技术研究发展 (863) 计划探索课题 (2002AA629160); 国家自然科学基金资助项目 (30271036); 山东省自然科学基金资助项目; 山东省科学技术发展计划 (2005GG3205071)

作者简介: 尤锋 (1963-), 女, 山东青岛人, 副研究员, 博士, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: youfeng@ms.qdio.ac.cn

1.2 基因组总 DNA 的提取与浓度测定

基因组 DNA 的提取参照汪永庆等^[13]的高盐法,取漠斑牙鲆-70℃保存的肌肉组织 50~100 mg 入 1.5 mL 离心管中,加入 400 μL 组织匀浆液(10 mmol/L Tris HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0; 100 mmol/L NaCl)。将样品剪碎混匀后,加入 45 μL 的 10% SDS (pH 7.2)、10 μL 的蛋白酶 K (20 g/L) 和 10 μL Rnase (10 g/L), 55℃ 消化 3 h, 每 20 min 颠倒混匀, 至溶液澄清后加入 400 μL 6 mol/L NaCl, 充分振荡混匀, 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液加入等体积的异丙醇, 轻轻混匀, -20℃ 沉淀 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤 2 次, 通风橱内晾干, 适量 TE (Tris-HCl 0.01 mol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8.0) 溶解。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, Beckman 紫外分光光度计测定浓度, 稀释至一定浓度, -20℃ 保存备用。

1.3 PCR

PCR 反应体系均为 25 μL, 包括: 1× PCR 反应缓冲液, 100 μmol/L 的 dNTPs, 2.0 mmol/L 的 Mg²⁺, 0.4 μmol/L 的随机引物, 1 u 的 Taq DNA 聚合酶, 50 ng 的模板 DNA。PCR 反应条件为: 94℃ 变性 5 min; 之后 45 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 1 min, 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min; 最后 72℃ 再延伸 10 min。PCR 扩增在本实验室 Eppendorf™ Mastercycler PCR 扩增仪上进行, 每次 PCR 均设有空白对照。PCR 产物于 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测, Pharmacia Biotech 的 ImageMaster VDS 紫外凝胶成像系统观察成像。每次电泳都有分子标记 Marker 做标记。

1.4 引物的筛选

通过 PCR, 以扩增产物谱带的有无、强弱、个体内一致性等为标准对 25 个 10 碱基的随机引物(由上海生工生物工程有限公司合成)进行筛选, 最终选择扩增谱带清晰、个体内一致性强、重复性强的引物用于常规群体分析。

1.5 数据统计与分析

在电泳谱带中相同的迁移位置, 将 DNA 片段的有和无定为 1 和 0。统计 PCR 产物谱带总数、多态谱带数及每条多态谱带在每个群体的分布频率, 多态谱带比例、群体平均杂合度 (H) 的计算公式如下^[14]:

多态谱带比例 = 总多态谱带数 / 总谱带数

$H = \sum_{i=1}^n (1 - X_i^2) / n$, 其中 X_i 为该群体第 i 条谱带出现的频率, n 为所检测的该群体的个体数。

2 实验结果

2.1 引物的筛选

经过筛选, 25 个随机引物中有 11 个能够得到清晰、稳定和可重复的扩增谱带, 被选取用于实验, 其余 14 个引物的扩增谱带不是很清晰而未做群体分析(见表 1)。

表 1 经筛选用于分析的 RAPD 随机引物及其序列

Tab. 1 The selected RAPD primers and their sequences

引物	引物序列(5'-3')	引物	引物序列(5'-3')
S17	AGGGAACGAG	S133	GGCTGCAGAA
S85	CTGAGACGGA	S134	TGCTGCAGGT
S86	GTGCCTAACC	S145	TCAGGGAGGT
S89	CTGACGTCAC	S189	TCTGTGTC
S94	GGATGAGACC	S199	GAGTCAGCAG
S128	GGGA TATCGG		

2.2 群体遗传多样性分析

漠斑牙鲆养殖群体筛选出 11 个随机引物进行分析, 共扩增出 77 条带, 多态谱带数为 51, 谱带大小在 100~2 000 bp 之间, 每个引物扩增谱带数为 2 到 11 条, 平均为 7 条。多态座位比例 (P) 和 H 分别为 66.23% 和 0.386 2。图 1 为用随机引物扩增的 RAPD 谱带。

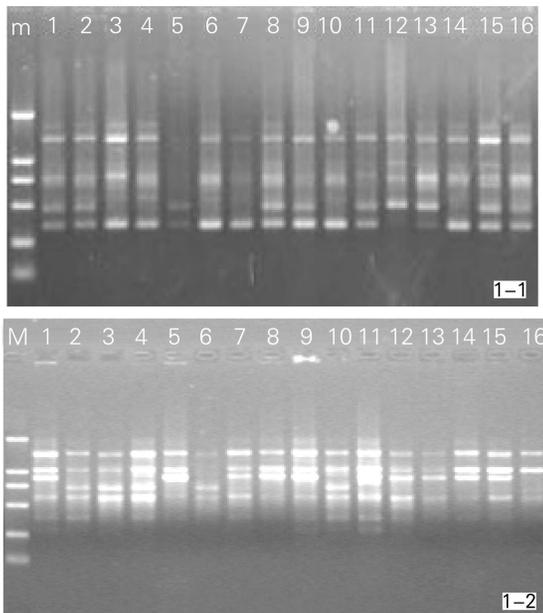


图 1 漠斑牙鲆养殖群体 RAPD 的电泳图谱

Fig. 1 RAPD electrophoregram in cultured stock of *P. lethostigma* generated

1-1. 引物 S133; 1-2. 引物 S145; m: 分子标记(DL2000)

1-1. S133 primer; 1-2. S145 primer; m: marker(DL2000)

3 讨论

本实验是采用高盐法提取样品鱼总 DNA 的。该方法省去了常规方法中酚仿抽提的烦琐步骤,所需时间短,通常 5~6 h 就能完成,产率也较高,获得的 DNA 片段在 20 kb 以上。而且,提取所用的试剂为常规试剂,不需要使用氯仿、酚等有毒试剂,不会对实验人员的健康产生危害。但缺点是所得的 DNA 片段略小,只有 20 kb 以上,可能不能满足进行 DNA 文库建立等要求较高的研究工作,但完全可以符合进行 RAPD 实验分析的要求。

由于漠斑牙鲆是近二三年前才由美国引进,因此,国内外相关文献多集中在生物学特性、分布和养殖特性方面,遗传多样性研究不是很多。美国学者 Blandon^[10]曾采用同工酶方法,研究分布在大西洋西北部和墨西哥湾北部的漠斑牙鲆 8 个群体之间的分化程度,共分析了 46 种同工酶的 68 个基因座位,其多态座位比例分别为 4.41%~10.29% (99%),平均杂合度在 0.03~0.12 之间。而徐建鹏也曾对引自美国的漠斑牙鲆养殖子代,进行同工酶分析,发现漠斑牙鲆养殖群体的遗传变异很低,在所分析的 22 个基因座位中仅检测到一个多态座位,其多态座位比例和观察杂合度为 3.9% 和 0.001,甚至该摘要中大菱鲆养殖群体在所检测的 22 个座位中全部是单态。作者采用 RAPD 方法也对 2002 年引自美国的野生漠斑牙鲆在大华水产有限公司繁殖培育的养殖子一代群体进行了群体遗传多样性分析,该群体的多态谱带比例和群体平均杂合度分别为 66.23% 和 0.352 6,比上述作者用同工酶获得的结果明显偏高。同工酶作为一种成熟的种群遗传变异分析技术,其结果具有明显的特异性,实验条件的改变只能是带出现与否,而不能改变带型;为共显性,可清楚地区分纯合子和杂合子;所有等位基因同等表达;由此分析获得的数据准确性高可靠性强;是稳定的遗传标记。但同工酶电泳图谱的状况会受到基因表达过程中转录、翻译和生物发育时期及外界因素的影响,还有,其信息量比较低,也即同工酶所能分析的座位比较有限,所以其分析结果具有一定的局限性,在国外往往加大其检测的样品数(50~100 尾)、同工酶数和基因座位数(至少 30 个以上,一般都超过 50 个,有的超过 100 个)来降低其负面效应,如此其工作量比较大。而 90 年代发展起来的 RAPD 分析技术格外引人注目,虽然其为显性的,不能分辨出是纯合性还是杂合性^[15],也很难确定是否反映了等位基因的有或无;可是它所显示的多态性要比同工酶

的高得多,因为大部分的 RAPD 的变异是源于非编码区和重复 DNA,可以说遍布整个基因组^[6]。由此,本实验结果与大多数学者的结果类似:RAPD 分析要比同工酶分析获得的遗传变异参数值高,充分显示了 RAPD 在遗传变异分析中的高效性。这也是该项技术前几年已成为种的鉴别和种群遗传结构研究的有力工具的原因。

本实验结果与亲缘关系较近的同属于牙鲆属的牙鲆养殖群体遗传分析结果进行比较发现也偏高,Exadactylos 等^[17]用 11 种酶编码的 14 个基因座位对欧洲 7 种鲆鱼鱼类 17 个种群进行同工酶分析,其中鳎(*Solea solea*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的多态座位比例分别为 71.4%~85.7%,21.4%,平均观察杂合度分别为 0.046~0.165 和 0.045,虽然多态座位比例鳎的比较高,但其杂合度也都明显低。邹署明^[18]对山东牙鲆一个养殖群体 RAPD 遗传变异分析的结果是其多态座位比例仅为 15.4%、平均遗传相似度是 0.905,但其样品较少,只有 8 尾,不能满足群体分析的要求。黎中宝^[19]应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究了牙鲆福建和山东养殖群体(F1 代)的生化遗传结构,其多态座位比例为 14.29%~23.81%,观察杂合度为 0.099~0.104。尤锋^[20,21]等利用同工酶技术得到的牙鲆养殖群体多态片段比例为 24.1% 和 34.9%,平均杂合度为 0.078 8 和 0.225 5。本实验结果偏高的原因可能是,中国牙鲆的养殖已经开展了近 20 a 了,其养殖群体亲本的数量往往较少,并且很少做到定期补充野生亲本,从而导致了近交衰退,使其遗传多样性下降;而作者实验中所选取的漠斑牙鲆样品为从美国引进的野生漠斑牙鲆的子一代,其遗传多样性尚未发生明显下降。

通过分析,获知该漠斑牙鲆养殖群体的遗传多样性水平,今后应该加强其未来养殖中亲本群体的遗传管理,切实维持育苗亲本的适当大小、定期从原产地美国的自然海区更换亲鱼、进行必要的提纯复壮等科学措施,使其养殖业能够健康和可持续发展。

参考文献:

- [1] Roland E, Reagan Jr, Wingo W M. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico): southern flounder[J]. **Biological Report**, 1985, 82: F 7.
- [2] Gilbert C R. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Florida)-southern, gulf, and summer flounders[R]. Gainesville Florida US: Florida State

- Museum, University of Florida, 1986.
- [3] Schwarz M H. Advances in flounder, *Paralichthys* spp. culture[J]. **J of Applied Aquaculture**, 2001, **11** (1/2): 1-9.
- [4] Lee C S, Ostrowski A C. Current status of marine finfish larviculture in the United States[J]. **Aquaculture**, 2001, 200: 89-109.
- [5] 杨学宋, 孙瑞晓. 漠斑牙鲆养殖技术概要[J]. 渔业现代化, 2004, 3: 56-58.
- [6] van Maaren C C, Kita J, Daniels H V. Temperature tolerance and oxygen consumption rates for juvenile southern flounder *Paralichthys lethostigma* acclimated for five different temperature[J]. **UJNR Technical Report**, 2000, 28: 135-140.
- [7] Luckenbach J A, Sullivan C V. Effective GnRH a dose and gamete ratio for reproduction of southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert 1884) [J]. **Aquaculture Research**, 2004, **35**(15): 1482-1486.
- [8] 王波, 张朝辉, 左言明, 等. 牙鲆属主要经济鱼类的生物学及养殖研究概况[J]. 海洋水产研究, 2004, **25** (5): 86-92.
- [9] 李树国. 漠斑牙鲆的生物学[J]. 水利渔业, 2005, **25** (3): 33-34.
- [10] Blandon I R, Ward R. Preliminary genetic population structure of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, along the Atlantic Coast and Gulf of Mexico [J]. **Fishery Bulletin**, 2001, **99**(4): 671-678.
- [11] 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 遗传多样性研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, **31** (1): 1-7.
- [12] Fevolden S E, Martinez I, Christiansen J S. RAPD and scnDNA analyses of polar cod, *Boreogadus saida* (Pisces, Gadidae), in the north Atlantic [J]. **Sarsia**, 1999, 84: 99-103.
- [13] 汪永庆, 王新国, 徐来祥, 等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进[J]. 动物学杂志, 2001, **36**(1): 27-29.
- [14] Apostol B L, Black I V W C, Reiter P, et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico [J]. **Heredity**, 1996, 76: 325-334.
- [15] Liu, Z J, Li P, Argue B J, et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish [J]. **Aquaculture**, 1999, 174: 59-68.
- [16] Callejas C, Ochando M D. Identification of spanish barbel species using the RAPD technique [J]. **J Fish Biol**, 1998, 53: 208-215.
- [17] Exadactylos A, Thorpe J P. Allozyme variation and genetic interrelationships between seven flatfish species (Pleuronectiformes) [J]. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 2000, 132: 487-499.
- [18] 黎中宝. 牙鲆养殖群体遗传结构的研究[J]. 海洋学报, 2004, **26**(3): 102-108.
- [19] 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[J]. 中国水产科学, 2001, **7** (4): 6-9.
- [20] 尤锋, 王可玲, 相建海. 山东近海褐牙鲆自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析[J]. 海洋与湖沼, 2001, **32**(5): 512-518.
- [21] You Feng, Xiang Jian hai, Song Lir sheng, et al. Genetic variation in natural and cultured populations of Shandong *P. olivaceus* as revealed by RAPD [J]. **Studia Marina Sinica**, 2002, 44: 228-234.

Primary analysis on genetic diversity in cultured stock of *Paralichthys lethostigma*

YOU Feng¹, WU Zhihao¹, WANG Wei^{1,2}, XU Dongdong¹, XU Jiange^{1,3}, NI Jing¹, SUN Wei¹, ZHANG Peijun¹, XU Yongli¹, YANG Xuesong⁴, SUN Shouke⁴

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 4. Dahua Fishing Limited Company of Laizhou, Laizhou 261418, China)

Received: Oct., 19, 2005

Key words: *Paralichthys lethostigma*; cultured stock; RAPD; genetic diversity

Abstract: The genetic diversity of a cultured stock in *Paralichthys lethostigma* which the parental stock introduced from America was studied as revealed by RAPD markers. Fish samples (24 individuals) were collected from Dahua Fishing Limited Company of Laizhou in October, 2004. Their total DNA was extracted from muscle tissue of sample using high salty method. The main results show as follows: 11 from 25 random primers were selected to use for stock experiment. Seventy seven clear repeatable RAPD bands ranged from 100 to 2 000 bp were recorded separately, and an average of 7 bands was gained by per primer. The mean percentage of polymorphic loci (P) of this stock was 66.23% and the average heterozygosity (H) of it was 0.3526.

(本文编辑: 刘珊珊)