

# 花鲈皮肤溃疡病抗性和敏感群体的 RAPD 分析

薛良义, 杨巧一, 韦家永, 李 卢

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:**采用随机扩增多态性 DNA 技术,对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)皮肤溃疡病抗性和敏感两个群体的遗传多样性进行了研究。从 100 个 10 bp 随机引物中筛选出 25 个随机引物,在两个群体中共扩增了 326 个位点,抗性群体多态位点比率为 44.24%,遗传变异度为 0.123 7,Shannon 多样性值为 0.1149,分别比敏感群体高 3.87%,5.82%和 2.68%,表明花鲈抗病群体比敏感群体具有更丰富的遗传多样性。25 条随机引物中,7 条引物在两群体中的扩增结果存在差异,其中 S11,S15,S4,S414,S416,S9 在抗性群体的扩增结果比敏感群体多 1 个多态位点,S52 多 2 个多态位点。在这 8 个特异多态位点中,S52-1,S4-1,S414-6,S9-2 在敏感群体中全部出现,呈单态性;S15-5,S11-6,S416-6,S52-5 只在抗性群体中出现,出现频率分别为 38.5%,30.8%,23.1%和 23.1%。说明这 8 个位点在两群体中存在较大的差异。研究表明,花鲈皮肤溃疡病在遗传上是比较复杂的,并不是简单地与某个遗传标记有关,可能与多个遗传因素相关。

**关键词:**花鲈(*Lateolabrax japonicus*); 群体; 皮肤溃疡病; RAPD; 遗传多样性

**中图分类号:** Q953

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2009)06-0061-06

花鲈(*Lateolabrax japonicus*),又称七星鲈、海鲈,为广温、广盐性凶猛肉食性经济鱼类。由于其具有生长快,适应广,效益好等特点而成为海水养殖的主要种类。但近年来,花鲈皮肤溃疡病成为浙江省海水网箱养殖的最主要的病害。该病一般每年 7 月份开始发生,一直延续到 10 月份,8~9 月份为高峰期<sup>[1]</sup>。已经确定该病由哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)引起,发病范围大,感染率高,死亡率一般为 20%~60%,有时高达 80%<sup>[2,3]</sup>。这给渔民造成了极大的经济损失,一定程度上阻碍了花鲈养殖业的发展。

DNA 随机扩增多态性 (RAPD) 技术是建立在 DNA 序列体外酶促扩增的多聚酶链式反应 (PCR) 基础上的 DNA 分子多态性检测技术<sup>[4,5]</sup>。该方法简便,快速,灵敏性高,所需 DNA 量少,能分析大量样品,且无需知道目的 DNA 片段序列信息,因此,已广泛用于种质鉴定<sup>[6,7]</sup>、遗传作图<sup>[8,9]</sup>、亲缘关系和系统进化<sup>[10,11]</sup>、遗传多样性<sup>[12,13]</sup>等方面。近几年,应用 RAPD 技术进行动、植物抗病性遗传分析也得到了迅速发展,已经找到了家蚕(*Bombyx mori*)抗核型多角体病<sup>[14]</sup>、芸芥(*Eruca sativa* Mill.)抗菌核病<sup>[15]</sup>、小麦抗白粉病等的分子标记<sup>[16]</sup>。而国内却还未见有 RAPD 应用于鱼类抗病相关性研究的报道。作者采用人工感染的方法,获得了花鲈皮肤溃疡病抗性和敏感性群体,应用 RAPD 技术对两个群体的遗传多样性进行了研究,以期筛选出与抗病性状相

关的分子遗传标记,为进一步的基因定位、建立连锁图谱以及花鲈的分子辅助育种技术提供有力的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

花鲈从宁波象山港养殖花鲈直销经营户购买,苗种为人工繁育,平均体长为 32.1 cm±2.3 cm,体质量 0.492 kg±0.046 kg。分 7 个玻璃缸(1.2 m×0.8 m×1 m)暂养于人工海水中(盐度为 29.4,温度 25℃),每缸放养健康鲈鱼 10 尾,连续充气,并根据水质情况换水。

病原菌哈氏弧菌由宁波大学水产系病害防治实验室提供,该菌从患病的网箱养殖鲈鱼中分离,并经致病性鉴定后保存。注射前 1 d,用 TCBS 培养基培养病原菌。

Taq DNA 聚合酶购于大连 TaKaRa 公司,其余生化试剂购于上海生工生物工程技术服务有限公司。

收稿日期:2006-02-26; 修回日期:2009-04-03

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(302438);宁波市青年基金资助项目(2003A62023)

作者简介:薛良义(1962-),男,浙江象山人,教授,主要从事鱼类分子生物学研究,E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn

## 1.2 人工感染

花鲈暂养 3 d 后挑选出 69 尾外观正常,健康活泼的个体,根据预实验结果,每尾鱼腹腔注射 0.2 mL 哈氏弧菌菌液,菌液密度为  $3.0 \times 10^8$  个/mL。人工感染后的鲈鱼均分在 7 个玻璃缸中暂养。敏感症状明显的个体临死时解剖取肌肉组织,放置于 1.5 mL 离心管。注射后两周没有症状的个体,直接解剖取样,作为抗性群体。所有样品取样后立即置于  $-70^\circ\text{C}$  超低温冰箱保存备用。

## 1.3 基因组 DNA 的提取

在离心管剪碎 150~200 mg 肌肉组织,加入 500  $\mu\text{L}$  消化液 (100 mmol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-Cl, pH8.0; 25 mmol/L EDTA, pH8.0; 1.0% SDS) 和终浓度为 100 mg/L 的蛋白酶 K,置于  $55^\circ\text{C}$  水浴中消化完全。加入 RNA 酶  $37^\circ\text{C}$  消化 30 min,再经过饱和酚、酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)、氯仿/异戊醇 (24:1) 各抽提 1 次,无水乙醇  $-20^\circ\text{C}$  沉淀 4~6 h。高速离心,去上清,70% 乙醇洗涤沉淀两次。最后溶解于 TE (pH = 8.0) 或灭菌双蒸水中,置  $4^\circ\text{C}$  保存备用。所提取的 DNA 经 Cary 100 紫外/可见分光光度计 (美国 BIO-RAD 公司) 定量,其  $\text{OD}_{260/280}$  在 1.75~1.90,并用电泳-EB 染色检测。

## 1.4 随机引物

从上海生工生物工程技术有限公司合成的 100 个 10 bp 的随机引物 (S1~S20, S41~S60, S201~S220, S301~S320 和 S401~S420) 中预备实验选出重复好、图谱清晰、具有多态性的引物 25 个,用于所有个体基因组 DNA 的 PCR 扩增。

## 1.5 RAPD-PCR 反应

参照 Williams 等<sup>[4]</sup>的方法,以  $\text{Mg}^{2+}$  浓度、模板浓度、引物浓度、dNTP 浓度、Taq 酶用量和退火温度等 PCR 的主要影响因子对 RAPD 反应条件进行优化,确定适合本实验的反应体系和反应程序。反应总体积 25  $\mu\text{L}$  包括:  $10 \times$  buffer (100 mmol/L Tris-Cl, pH8.3; 200 mmol/L KCl) 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ; 基因组 DNA 50 ng; Taq DNA 聚合酶 1 U; dNTP (10 mmol/L) 0.25  $\mu\text{L}$  以上反应体系在美国 Applied Biosystems 公司生产的 GeneAmp PCR System 9600 型 PCR 仪中经  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min 后进入 35 个循环;即  $94^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $38^\circ\text{C}$  退火 1 min,  $72^\circ\text{C}$  延伸 2 min,最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物

用 1.3% 的含 EB 的琼脂糖凝胶电泳 (4 V/cm) 分离,用 FR-980 生物电泳图像分析仪观察、拍照。

## 1.6 数据处理

经人工感染后,获得敏感群体的个体数为 41 尾,抗性群体的个体数为 28 尾。根据 RAPD 产物的电泳带型,进行群体内和群体间的比较分析。

多态位点比率计算公式为  $P = \text{多态扩增片段} / \text{扩增片段总数}$ 。根据 Nei 等<sup>[17]</sup>方法,经电泳后获得的基因组 DNA 指纹图谱,由于个体之间序列差异而产生多态性用双等位系统来解释,即每个座位上相应谱带的存在 (记为 1) 或缺失 (记为 0)。任意两个个体间的遗传相似度  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ,  $N_x$  和  $N_y$  为个体  $x$  和  $y$  分别拥有的 RAPD 标记数,  $N_{xy}$  是  $x$  和  $y$  两个体共享的 RAPD 标记数;遗传变异度  $D = 1 - F$ 。通过对群体内所有个体间的遗传相似度  $F$  和遗传距离  $P$  值简单平均即可获得群体内遗传相似度和遗传距离。

同时参照 Luciance 等<sup>[18]</sup>的方法,采用 Shannon 系数分析群体遗传多样性:  $\{H\}_{\text{bit}} = - \sum_{i=1}^k P_i \ln P_i$  式中,  $\{H\}_{\text{bit}}$  为全部引物所检测到的被测群体所有个体全部位点 (包括单态位点和多态位点) 的多样性,也即 RAPD 总带数的多样性;  $k$  为所统计全部位点 RAPD 总带数;  $P_i$  为某位点 (某条 DNA 带) 在被检测群体中的出现频率。该公式采用信息量描述生物群体中某种生命现象的离散性,即多样性  $H$  值愈大则群体的离散性愈高、多样性愈丰富。Shannon 指数多样性值 (Shannon weaveis value of phenotypic diversity)  $H = \{H\}_{\text{bit}} / N$ ,  $N$  为 RAPD 扩增的总带数。

## 2 结果

### 2.1 人工感染

花鲈皮肤溃疡病的主要症状表现为发病初期病鱼体色趋深,皮肤、尾鳍和上、下颌吻部开始充血。这时常见病鱼上浮沿边离群独游,不摄食。继而,鳞片松散易脱落,皮下出血,肛门发红,头颅两侧、尾鳍末端以及体侧出现红斑,逐渐发生溃疡,呈现不同程度的溃疡斑,重者肌肉烂穿,甚至吻部断裂<sup>[2]</sup>。出现上述症状者定为敏感个体,临死前解剖取肌肉。据王国良等<sup>[1,2]</sup>的调查结果:在典型的发病网箱内从出现少量病鱼到大部分发病死亡历时约一周,本实验

在花鲈注射哈氏弧菌菌液后两周没有症状的个体定为抗性群体。人工感染的统计结果为敏感个体 41 尾,抗性个体 28 尾。

## 2.2 RAPD 扩增结果

本实验筛选出的 25 条随机引物,扩增条带数在 3~9 条。两个群体共得到了 326 个 RAPD 标记带,其中敏感群体占 161 个,多态位点为 65 个,多态比率为 40.37%,抗性群体占 165 个,多态位点数为 73 个,多态比率为 44.24%。

25 条随机引物中,18 条引物在两个群体中扩增结果相同。如引物 S409 在两个群体中均扩增出了 6 个位点,其中有 1 个位点具有多态性,而且这些位点在两群体是对应一致的(图 1)。7 条引物(S11、S15、S4、S414、S416、S9、S52)在两群体中的扩增结果存在差异(表 1),其中 S11、S15、S4、S414、S416、S9 在抗性群体扩增结果比敏感群体多 1 个多态位点,S52 多 2 个多态位点,其他扩增位点相同,如 S9 在两群体中均扩增出 4 个位点,其在敏感群体有 1 个多态位点,而在抗性群体有 2 个多态位点(图 2)。

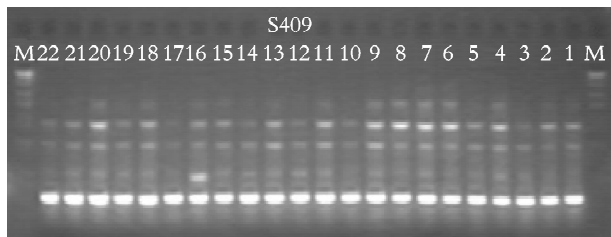


图 1 S409 扩增结果

Fig.1 The PCR result of primer S409

1~9 为敏感个体,10~22 为抗性个体(图 2 同)

1~9 stands for susceptibility individuals, 10~22 stands for resistance individuals(the same as fig. 2)

表 1 在两群体中扩增结果存在差异的随机引物序列及其扩增效果

Tab.1 The sequence of the primers generated different-amplifications in two *Lateolabrax japonicus* populations and their PCR results

| 引物   | 引物序列        | 敏感群体  |       | 抗性群体  |       |
|------|-------------|-------|-------|-------|-------|
|      |             | 扩增位点数 | 多态位点数 | 扩增位点数 | 多态位点数 |
| S11  | GTAGACCCGT  | 5     | 3     | 6     | 4     |
| S15  | GGAGGGTGTT  | 7     | 3     | 8     | 4     |
| S4   | GGA CTGGAGT | 5     | 2     | 5     | 3     |
| S414 | AGGGTCGTTC  | 6     | 2     | 6     | 3     |
| S416 | GTAACCAGCC  | 5     | 2     | 6     | 3     |
| S52  | CACCGTATCC  | 6     | 1     | 7     | 3     |
| S9   | TGGGGGACTC  | 4     | 1     | 4     | 2     |
| 合计   |             | 38    | 14    | 39    | 22    |

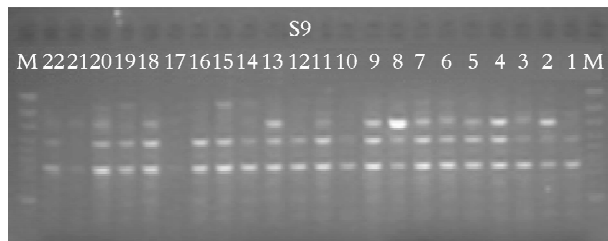


图 2 S9 扩增结果

Fig.2 The PCR result of primer S9

## 2.3 敏感与抗性群体遗传多样性

根据公式计算出两个群体的遗传多样性(表 2),敏感群体内个体遗传相似度为 0.819 2~0.951 7,平均为 0.883 1,遗传变异度为 0.116 9。抗性群体为 0.773 1~0.928 3,平均为 0.876 3,遗传变异度为 0.123 7。两个群体的 Shannon 多样性指数和多样性值:敏感群体为 18.790 5 和 0.111 9,抗性群体为 19.424 8 和 0.114 9。Shannon 多样性指数是群体遗传多样性高低的指标,值越大,群体的离散性越高,多样性越丰富。抗性群体 Shannon 多样性指数、多样性值和群体内遗传变异度均略高于敏感群体,而群体内的遗传相似度敏感群体略高于抗性群体,表明抗性群体的多样性较为丰富。

## 2.4 抗性群体特异多态位点

统计结果显示,抗性群体比敏感群体多 8 个多态性位点,即 S11-6(引物 S11 扩增出的第 6 个位点,下同)、S15-5、S4-1、S414-6、S416-6、S52-1、S52-5、S9-2,各个特异多态位点在抗性群体中的频率见表 3。在这 8 个特异多态位点中,4 个位点(S52-1、S4-1、S414-6、S9-2)在敏感群体中全部出现,呈现单态性,4 个位点(S11-6、S15-5、S416-6、S52-5)只在抗性群体中出现,在敏感群体中都没有出现。

表 2 敏感与抗性群体遗传多样性

Tab.2 The genetic diversity indexes of the infected population and the resistance population

| 群体   | 多态位点比率(%) | 遗传相似度   | 遗传变异度   | Shannon 多样性值 |
|------|-----------|---------|---------|--------------|
| 敏感群体 | 40.37     | 0.883 1 | 0.116 9 | 0.111 9      |
| 抗性群体 | 44.24     | 0.876 3 | 0.123 7 | 0.114 9      |

表 3 抗性群体特异多态位点的频率

Tab.3 Frequencies in the special polymorphic loci in the resistance population

| 特异多态位点 | 多态频率(%) | 特异多态位点 | 多态频率(%) |
|--------|---------|--------|---------|
| S52-1  | 69.2    | S15-5  | 38.5    |
| S4-1   | 61.5    | S11-6  | 30.8    |
| S414-6 | 61.5    | S416-6 | 23.1    |
| S9-2   | 46.8    | S52-5  | 23.1    |

### 3 讨论

现代遗传学认为,一个物种的遗传变异的大小往往与此物种对环境的适应能力密切相关。对花鲈的群体遗传学研究已有不同的报道:利用同工酶技术,徐成等<sup>[19]</sup>得出青岛花鲈多态位点比例为25.8%、平均杂合度为0.099,而汕头花鲈多态位点比例为22.6%、平均杂合度为0.079;李明云等<sup>[20]</sup>得出山东日照与福建厦门花鲈群体的平均杂合度分别为0.111 2和0.093 9。利用RAPD技术,李明云等<sup>[21]</sup>得出山东日照花鲈群体 Shannon 多样性指数和多样性值为20.326 8和0.247 9,福建厦门花鲈群体 Shannon 多样性指数和多样性值分别为11.424 2和0.243 1。这些结果表明不同地区花鲈群体之间存在较大的遗传差异。本实验中,敏感和抗性两个群体的 Shannon 多样性值均小于山东日照和福建厦门花鲈群体,可能与本实验中花鲈为人工繁育苗有关。

从所有引物的扩增结果比较,花鲈皮肤溃疡病抗性群体在多态位点比率、遗传变异度和 Shannon 多样性值等方面都比敏感群体高(表2),但统计学上的差异不明显。从扩增结果存在差异的7条引物来看,两个群体之间的差异还是明显的。另外,从遗传变异度来看,通过与其他鱼类的横向比较发现(表4),花鲈皮肤溃疡病抗性群体和敏感群体的基因组

DNA 还维持在较高的多态性水平,人工养殖过程中人为干扰因素较少。这是由于天然海域的自然群体还比较大,能够维持足够数量的亲鱼群体,就有效地避免了近亲繁殖;而花鲈的人工养殖历史也比较短,很少有定向选择,这就有效地维持了养殖群体的遗传多样性。

对抗性群体的8个特异多态位点进行分析发现,S52-1,S4-1,S414-6,S9-2位点的频率比较高,分别为:69.2%,61.5%,61.5%和46.8%,这4个特异多态位点在敏感群体中全部出现,表现为单态性,这说明两个群体在这些位点的相似性比较高。而S15-5,S11-6,S416-6,S52-5位点的频率比较低,分别为:38.5%,30.8%,23.1%和23.1%,但是这4个位点在敏感群体中没有扩增出来,说明这4个位点在两个群体中存在较大的差异。在抗性群体特有的这4个多态性位点中,有69.2%的花鲈个体能够扩增出至少一个抗性群体特有的多态性位点,23.1%有2个,7.69%有3个。周忠等<sup>[27]</sup>对甘薯茎线虫病抗性与敏感性品种遗传多态性做了RAPD分析,未找到品种间的RAPD标记。孟宪红等<sup>[28]</sup>也应用RAPD技术对经过选育抗白斑综合症病毒(WSSV)的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)及与其来源相同的野生群体进行了分析,找出了在野生群体中未出现的3个位点,而在抗性群体中出现的频率为5%~45%,未能找到与抗病性状相关的遗传标记。Ferguson等<sup>[29]</sup>利用同工酶技术对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)细菌性鳃病抗性群体和敏感群体的研究表明:在9个多态酶位点中,抗性群体在6个位点上的杂合度高于敏感群体,而另外3个则相反。这就意味对于某些疾病来说,并不是简单地与某个遗传标记有关,可能与多个遗传因素有关。也就是说花鲈皮肤溃疡病在遗传上是比较复杂的,其在分子水平上的研究还有待于进一步深入研究。

表 4 各种鱼类遗传变异程度的比较

Tab.4 The comparison in genetic variation indexes of some kinds of fish

| 鱼类  | 遗传相似度   | 遗传变异度   | 变异程度判断 | 参考文献 |
|---|---------|---------|--------|------|
| 镜鲤( <i>Cyprinus carpio</i> var. <i>specularis</i> )(德国) | 0.827   | 0.173   | 较高     | [22] |
| 镜鲤( <i>C. carpio</i> L. <i>mirror</i> )(苏联)             | 0.787   | 0.213   | 较高     | [22] |
| 红鲤( <i>C. carpio</i> var. <i>singguonensis</i> )(兴国)    | 0.722   | 0.278   | 较高     | [22] |
| 梭鱼( <i>Liza haemalocheila</i> )(养殖)                     | 0.839 3 | 0.160 7 | 较高     | [23] |
| 梭鱼(自然)  | 0.857 1 | 0.142 9 | 较高     | [23] |
| 鲢( <i>Silurus asotus</i> )                              | 0.619 3 | 0.370 7 | 高      | [24] |
| 褐首鲢( <i>Ictalurus nebulosus</i> )                       | 0.926 9 | 0.073 1 | 低      | [24] |
| 尼罗罗非鱼( <i>Oreochromis niloticus</i> )                   | 0.902 3 | 0.107 7 | 较高     | [25] |
| 澳大利亚罗非鱼( <i>Oreochromis aurus</i> )                     | 0.950   | 0.050   | 低      | [26] |
| 尼罗罗非鱼(湘湖群体)   | 0.798   | 0.202   | 较高     | [26] |
| 尼罗罗非鱼(美国群体)   | 0.795   | 0.205   | 较高     | [26] |
| 尼罗罗非鱼(沙市群体)   | 0.824   | 0.176   | 较高     | [26] |
| 花鲈抗性群体  | 0.876 3 | 0.123 7 | 较高     | 本文   |
| 花鲈敏感群体  | 0.883 1 | 0.116 9 | 较高     | 本文   |

参考文献:

[1] 王国良, 薛良义, 金珊, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃瘍病的流行病学研究 [J]. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 392-395.

[2] 王国良, 金珊, 薛良义, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃瘍病及其病原菌的研究 [J]. 黄渤海海洋, 2000, **18**(3): 5-89.

[3] 金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃瘍病的防治药物 [J]. 台湾海峡, 2000, **19**(2): 233-236.

[4] Willams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. **Nucl Acids Res**, 1990, **18**: 6 531-6 536.

[5] Wesh J, Honeycutt R J. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. **TAC**, 1992, **82**: 473-475.

[6] Yamagishi M, Matsumoto S, Nakatsuka A, *et al.* I-identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis [J]. **Sci Hortic**, 2005, **105**: 283-290.

[7] Lina P, Robert J W. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. **Mol Cell Probe**, 1996, **10**: 435-441.

[8] Muraguchi H, Ito Y, Kamada T, *et al.* A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNAs and restriction fragment length polymorphisms [J]. **Fungal Genet Biol**, 2003, **40**: 93-102.

[9] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance [J]. **Aquaculture**, 2004, **238**: 165-172.

[10] Cepicka I, KutišováK, Tachezy J, *et al.* Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism [J]. **Vet Parasitol**, 2005, **128**: 11-21.

[11] Wang C H, Li S F. Phylogenetic relationships of ornamental (koi) carp, Oujiang color carp and Long-fin carp revealed by mitochondrial DNA COII gene sequences and RAPD analysis [J]. **Aquaculture**, 2004, **231**: 83-91.

[12] Wei L, Liqun X, Jianqiang L, *et al.* Genetic diversity of *Potamogeton maackianus* in the Yangtze River [J]. **Aquat Bot**, 2004, **80**: 227-240.

[13] Bingrui W, Weiguo L, Jianbo W. Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China [J]. **Aquat Bot**, 2005, **81**: 277-283.

[14] 刘晓勇, 姚勤, 陈克平. 利用 RAPD 技术筛选家蚕抗核型多角体病分子标记 [J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2004, **25**(1): 17-20.

[15] 钟军, 戴林建, 李 杓, 等. 芸芥抗菌核病相关基因的分子标记 [J]. 作物学报, 2005, **31**(3): 395-397.

[16] 徐如宏, 任明见, 黄世全, 等. 小麦抗病种质贵农 775 中抗白粉病基因的 RAPD 标记 [J]. 作物学报 2005, **31**(2): 243-247.

- [17] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 5 269-5 273.
- [18] Luciane G, Suzana C M. Genetic variation in natural populations of mate (*Llex paraguariensis* A. St. Hil, Aquifoliaceae) using RAPD markers [J]. *Heredity*, 2000, 84: 647-656.
- [19] 徐成, 王可玲, 张培军, 等. 鲈鱼群体生化遗传学研究 II. 种群生化遗传结构及其鉴别的研究 [J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(2): 248-253.
- [20] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈同工酶的遗传变异分析 [J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2003, 22(2): 121-124.
- [21] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈遗传多样性的 RAPD 研究 [J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6): 618-624.
- [22] 董在杰, 夏德全, 吴婷婷, 等. RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用 [J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 37-40.
- [23] 权洁霞, 戴继勋, 沈颂东, 等. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机多态性 DNA(RAPD)分析 [J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 82-87.
- [24] 赵文学, 孙玉华, 邵雪玲, 等. 用 RAPD 技术对鲢和褐首鳊遗传多样性的研究 [J]. 武汉大学学报(理学版), 2001, 47(6): 782-784.
- [25] 胡隐昌, 宋平, 李懋, 等. 尼罗罗非鱼 RAPD 标记及其遗传多样性分析 [J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(5): 94-97.
- [26] 夏德全, 曹莹, 吴婷婷, 等. 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用 [J]. 水产学报, 1999, 23(1): 27-32.
- [27] 周忠, 王欣, 马代夫, 等. 甘薯抗、感茎线虫病品种遗传多态性的 RAPD 分析 [J]. 江苏农业学报, 2005, 21(1): 35-39.
- [28] 孟宪红, 孔杰, 刘萍, 等. 中国明对虾抗白斑综合症病毒分子标记的筛选 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 14-19.
- [29] Ferguson M M, Drahushchak L R. Disease resistance and enzyme heterozygosity in ranbow trout [J]. *Heredity*, 1990, 64: 413-417.

## Genetic diversity analysis based on RAPD for resistance and susceptibility stocks of *Lateolabrax japonicus* to the skin ulcer disease

XUE Liang-yi, YANG Qiao-yi, WEI Jia-yong, LI Lu

(College of Life Science & Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Feb., 26, 2006

Key words: *Lateolabrax japonicus*; stock; skin ulcer disease; RAPD; genetic diversity

**Abstract:** The genetic diversity of resistance and susceptibility stocks of *Lateolabrax japonicus* to the skin ulcer disease was studied by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Twenty-five random primers, which were screened from one hundred ones, were used for the analysis of nuclear DNA polymorphism of cultured *L. japonicus* in Xiangshan Bay. A total of 326 RAPD bands (loci) were detected in the two stocks. In the resistance stock, the proportion of polymorphic loci was 44.24%. The mean genetic variation index and Shannon Weaveis value of phenotypic diversity were 0.123 7 and 0.114 9, respectively. They were 3.87%, 5.82% and 2.68% higher than that of the suscepibility stock respectively. It was suggested that the genetic diversity of resistance stock was more abundant than that of suscepibility population. Seven of twenty-five primers generated different amplification patterns between the two stocks. In the resistance stock, six primers, S11, S15, S4, S414, S416 and S9, amplify 1 polymorphic locus more than the suscepibility stock respectively, and primer S52 amplify 2 polymorphic loci more than the suscepibility stock. In the above 8 polymorphic loci, S15-5, S11-6, S416-6 and S52-5 bands only existed in the resistance stock, which suggested genetic differences between two stocks. However, the relationship between these polymorphic loci and the disease resistance needs to be further investigated.

(本文编辑:谭雪静)