

漠斑牙鲆引进群体子一代遗传多样性的 RAPD 分析

李鹏飞^{1,2} 刘 萍^{1*} 柳学周¹

(¹ 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 青岛 266003)

摘要 运用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术对引进群体漠斑牙鲆 *Paralichthys lethostigma* 子一代 48 个个体的遗传多样性进行了分析,筛选的 40 个 10 bp 的随机引物中,25 个引物产生了稳定性好,可重复性强的谱带。共检测到 154 个位点,其中多态位点有 122 个,多态位点的比例为 79.22%,有效等位基因数为 1.5629 ± 0.3631 , Nei's 基因多样性指数为 0.3184 ± 0.1843 , Shannon 信息指数是 0.4651 ± 0.2574 。结果表明,漠斑牙鲆处于较高的遗传多样性水平。

关键词 漠斑牙鲆 遗传多样性 随机扩增多态 DNA

中图分类号 Q348 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0015-04

RAPD analysis of genetic diversity in first generation of introduced *Paralichthys lethostigma*

LI Peng-fei^{1,2} LIU Ping^{1*} LIU Xue-zhou¹

(¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT RAPD technique was used to analyze the genetic diversity of forty-eight fish samples from the first generation of introduced *Paralichthys lethostigma*. Twenty-five primers screened from 40 10bp primers produced highly repetitive and steady bands. 154 DNA fragments were identified, of which 79.22% (122 fragments) were polymorphic. The mean effective number of alleles per locus was 1.5629 ± 0.3631 , Nei's gene diversity index was 0.3184 ± 0.1843 , and Shannon's information index was 0.4651 ± 0.2574 . All the results indicated that *P. lethostigma* had high genetic variability.

KEY WORDS *Paralichthys lethostigma* Genetic diversity RAPD

漠斑牙鲆 *Paralichthys lethostigma* 俗称南方鲆 Southern flounder, 是鲽形目 Pleuronectiformes、鲽亚目 Pleuronectoidei、鲆科 Bothidae 牙鲆属的主要经济鱼类,分布在大西洋,属亚热带种类,在美国主要分布在北卡罗来纳至得克萨斯。由于漠斑牙鲆肉质细嫩、鲜美,并具有食性杂,适盐范围广,生长快,抗病力强,较耐高温,

国家基础条件平台项目(2006DKA30470)资助

* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291

收稿日期:2007-11-17;接受日期:2008-04-25

作者简介:李鹏飞(1978-),女,硕士,主要从事海水养殖生物种质资源与遗传多样性研究。

易活运等特点,在美国已倍受广大消费者和养殖户的青睐(李鹏飞等 2007)。2001年中国水产科学研究院黄海水产研究所首次从美国引进漠斑牙鲆,目前已成为新的养殖对象,因此,尽快对漠斑牙鲆的遗传结构进行基础性研究显得极为重要。在种质资源的遗传多样性研究方面,除作者等在2006年对漠斑牙鲆同工酶的分析外,尤锋等(2006a,b)采用SSR和RAPD技术对养殖群体进行了遗传多样性的分析。为了有效保护和利用漠斑牙鲆的资源,为漠斑牙鲆遗传育种提供基础数据,有必要对漠斑牙鲆的种质遗传结构进行进一步的研究。

随机扩增多态DNA(Random Amplified Polymorphic DNA,RAPD)技术是建立在PCR基础上的一种分子遗传比较技术,分析基因组DNA的多态性,具有检测灵敏,快速,方便,多态性强以及在不需要了解所研究对象的分子生物学基础就可以进行检测等特点。此技术自Williams等1990年提出以来,被广泛的应用于遗传多样性的检测(马春艳等 2004)、种属鉴定(陈超等 2001)、亲缘关系的划分、基因定位及遗传图谱的构建等领域。本研究采用RAPD技术对漠斑牙鲆的遗传多样性进行分析,研究其遗传背景,以期从DNA水平了解漠斑牙鲆的现状,为其资源的合理利用和保护提供依据,为分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

漠斑牙鲆于2004年9月22日取自黄海水产研究所2001年引种亲鱼中51尾产生的子一代,共48尾。平均体长12.2 cm,平均体重35.04 g。活体解剖,分别取肌肉组织适量,编号,迅速放入 -70°C 保存,用于基因组DNA的提取。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取和浓度测定

基因组DNA的提取参照文献(Liu *et al.* 2000)的方法。DNA浓度通过GeneQuant pro DNA定量分析仪和电泳-EB染色的荧光强度双重测定。

1.2.2 引物筛选

每个PCR反应总体积为25 μl ,其中含TaqDNA聚合酶1单位、dNTP 100 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 $10\times\text{PCR}$ 缓冲液2.5 μl ;引物(15 pmol/ μl) 1 μl 。在PTC-200扩增仪上经 94°C 预变性5 min后进行40个循环,每个循环包括 94°C 1 min, 36°C 1 min, 72°C 2 min,最后于 72°C 延伸10 min。每次反映均设置不含模板DNA的空白对照。本试验从40条随机引物中选取了25条重复性好、扩增带谱清晰和个体内一致性强的引物用于RAPD分析。

1.2.3 电泳检测

扩增产物用含溴化乙锭(EB)的1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,所用的Marker为DNA Marker DL2000,电泳结果用凝胶成像系统观察记录。

2 谱带记录与数据的统计与分析

RAPD标记符合孟德尔遗传规律,为显性标记,所以常以1个扩增产物片段作为1个位点来分析(Nei 1979)。参照已有文献(陈宜瑜 1990)记录DNA条带和进行数据处理,电泳谱带中的每一条带均为1个分子标记,并代表1个引物结合位点。只记录那些电泳后条带清晰的RAPD标记。当某一扩增出现(显性)时记为1,不存在(隐性)时记为0,据此统计得出所有位点的原始谱带矩阵。将RAPD标记看作是含两个复等位基因的位点系统,假设群体处于Hardy-Weinberg平衡对群体的遗传参数进行计算,用Popgene Version 1.32生物软件进行处理。

以多态位点比例、有效等位基因数、Nei's基因多样性指数和Shannon信息指数来量化群体的遗传多样性。

另外,群体内个体间遗传相似性系数根据Nei等(1972)提出的公式计算:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y), P = 1 - S_{xy}$$

式中, N_{xy} 是个体 x 和 y 的共有带数; N_x 和 N_y 分别是个体 x 和 y 的扩增带数。当 $S_{xy} = 1$ 时, 二者高度相似; 当 $S_{xy} = 0$ 时, 二者具有高度的相异性。 P 为遗传距离。

3 结果

3.1 RAPD 图谱分析

本实验采用 40 个随机引物对漠斑牙鲆进行扩增, 25 个引物(引物序列见表 1)对所有个体的 RAPD 检测产生了重复性好、条带清晰的谱带。经统计, 不同引物扩增条带数从 3~9 不等, 25 个引物共检测出了 154 位点, 平均每个引物提供 6 个位点的信息。图 1 为部分引物的扩增图谱。

3.2 遗传多样性分析

根据统计, 本实验 25 个随机引物共检测到的 154 位点中, 122 个位点表现出多态现象, 多态位点百分数为 79.22%, 并进一步计算了漠斑牙鲆的有效等位基因数、Nei's 基因遗传多样性指数及 Shannon 信息指数。结果表明, 漠斑牙鲆的有效等位基因数为 1.5629 ± 0.3631 , Nei's 基因多样性指数为 0.3184 ± 0.1843 , Shannon 信息指数是 0.4651 ± 0.2574 。

漠斑牙鲆群体的两个体间的遗传相似性最大为 1.0000, 最小为 0.8451。遗传距离范围在 0.0000~0.1349 之间。

4 讨论

与以往的形态学、细胞学和生化指标(同工酶、蛋白质)等方法相比, RAPD 技术是 DNA 分子水平的监测, 利用 DNA 多态性来直接分析种群内或种群间差异, 具有遗传信息丰富, 准确度高, 可比性强和易操作等特点, 已被广泛应用于鱼类的遗传多样性研究, 并被证明是有效的。

牙鲆属鱼类中, 邹曙明等(2001)利用 RAPD 方法, 获得褐牙鲆养殖群体的多态位点比例为 15.4%, 遗传相似度为 0.905, Shannon 遗传多样性指数为 2.735。尤锋等(2006)对山东近海褐牙鲆的野生群体和养殖群体遗传多样性也进行了 RAPD 分析, 获得了褐牙鲆野生群体的多态位点比例为 43.2%, 有效等位基因数为 1.38, Shannon 遗传指数为 0.1120, 养殖群体的多态位点比例为 34.9%, 有效等位基因频率为 1.28, Shannon 遗传指数为 0.0942。

对漠斑牙鲆的遗传多样性研究, 作者等曾用同工酶技术对该群体的遗传多样性进行了检测,

表 1 稳定扩增的 10 碱基随机引物序列

Table 1 Sequence of stably amplified random 10-base primers

引物序号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	引物序号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
S453	GTCAGAGTCC	S1033	ACGCTGCGAC
S466	GTGGGCTGAC	S1036	AAGGCACGAG
S477	TGACCCGCCT	S1044	GAATGCGACC
S1006	GTAAGCCCT	S1046	GTCGGAGTGG
S1009	AGAACCGAGG	S1049	ACGGCACGCA
S1010	GGGATGACCA	S1051	GAACGCTGCC
S1013	TGAGTCCGCA	S1053	CAGCCGTTCC
S1014	TGTGGCCGAA	S1054	ACCGATGCTG
S1016	CAAGGTGGGT	S1055	GAATCCGGCA
S1018	GGGCTAGTCA	S1056	TCTGGACCGA
S1019	GGCAGTTCTC	S1058	GGCTAGGTGG
S1028	AAGCCCCCA	S1060	ACACGTGGTC
S1030	TCGGGGCATC		

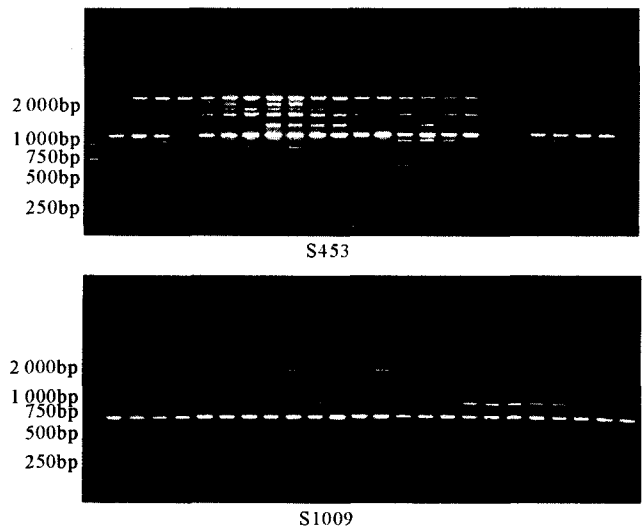


图 1 引物 S453 和 S1009 对漠斑牙鲆的 RAPD 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretograms of RAPD in *Paralichthys lethostigma* using primer S453 and S1009

结果显示其多态位点比例为 33.3%，有效等位基因数为 1.219 6，预期杂合度为 0.121 9。本试验利用 RAPD 方法，获得其多态位点比例为 79.22%，有效等位基因数为 $1.562 9 \pm 0.363 1$ ，Nei's 基因多样性指数为 $0.318 4 \pm 0.184 3$ ，Shannon 多样性指数是 $0.465 1 \pm 0.257 4$ 。虽然同工酶技术有不少优点，如杂合体共显性，可以不用人工杂交而迅速的确定亲本来源关系，探测物种隐藏的变异，但同工酶电泳图谱的状况受到基因表达过程中的转录和翻译、环境因子及生物个体发育状况的影响，同工酶电泳技术往往检测不出一些“隐性”或“中性”变异，所能分析的位点比较有限。另外，同工酶技术是对基因产物的分析，在遗传物质 DNA 上的覆盖面较窄，一些基因组上的变异并不能表达出来，其低的信息量有时能不足以进行群体结构分析，从而低估了遗传多样性水平。同工酶样品的采集和保存要求苛刻也是该技术应用的一大障碍。本研究采用 RAPD 技术对漠斑牙鲆群体进行遗传多样性分析，充分显示了 RAPD 在遗传变异分析中的高效性，同时对照同工酶遗传多样性分析，可以说基本上能反映漠斑牙鲆整个基因组的实际情况。对于 RAPD 标记的不准确性，Lynch 等在 1994 年提出可以通过提高测试的个体数和位点数来弥补。在本试验中，用 RAPD 分析所得到的位点数远远要高于同工酶分析所得到的位点数，确保了结果的可信性。针对 RAPD 结果可重复低的缺点，本试验也通过样品在相同的条件下处理，用同一批试剂严格控制 PCR 参数和试剂的配制等获得了重复性的结果。

通过计算群体的相似度，获得漠斑牙鲆群体内的相似度范围为 0.845 1 ~ 1.000 0，遗传距离的范围为 0.000 0 ~ 0.134 9，说明个体间的亲缘关系非常近，这与同工酶分析的结果相近。

就某物种而言，种内遗传多样性越丰富，在一般情况下，该物种对环境变化的适应能力就愈强，其生存于环境的潜力就愈大(陈宜瑜 1990; Lynch *et al.* 1994)。遗传多样性是物种适应各种环境变化而得以维持生存、发展和进化的基础，保护好物种的遗传多样性是提高该物种经济效益的前提。尤其作为引进品种漠斑牙鲆，渔业管理者和渔业养殖者应了解其遗传多样性，加强管理，制订相应的科学计划，确定原种的保护和开发利用措施，从而避免养殖后代退化的现象。本研究的结果表明，漠斑牙鲆具有较高的遗传多样性水平，为其资源的合理利用和保护提供了依据，为分子标记辅助育种奠定了基础。

参 考 文 献

- 马春艳,刘敏,马凌波,张凤英,陈亚覃. 2004. 长江口刀鲚遗传多样性的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析. 海洋水产研究, 25(5): 9~24
- 尤锋,王伟,吴志昊,徐冬冬,许建和,倪静,孙威,张培军,徐永立,杨学宋,孙寿科. 2006. 漠斑牙鲆 *Paralichthys lethostigma* 养殖群体微卫星座位遗传多态性的分析. 海洋科学进展, 24(2): 195~202
- 尤锋,吴志昊,王伟,徐冬冬,许建和,倪静,孙威,张培军,徐永立,杨学宋,孙寿科. 2006. 漠斑牙鲆养殖群体 RAPD 遗传多样性的初步分析. 海洋科学, 30(2): 86~90
- 李鹏飞,刘萍,柳学周,高天翔,王清印. 2006. 漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析. 中国水产科学, 13(1): 13~19
- 李鹏飞,刘萍,柳学周. 2007. 漠斑牙鲆染色体组型研究. 海洋水产研究, 28(4): 6~30
- 邹曙明,李思发,蔡完其. 2001. 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, 7(4): 6~9
- 陈宜瑜. 1990. 淡水生态系统中的若干生物多样性问题. 生物科学信息, 2(5): 197~200
- 陈超,石拓,孙曙光,于宏,孙中之,孔杰. 2001. 应用 RAPD 标记对东方鲀属进行种类鉴别及其聚类分析. 海洋水产研究, 22(3): 32~36
- 季维智,宿兵. 1999. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州: 浙江科学技术出版社, 135~136
- 金冬雁,黎孟枫等译. 1999. 分子克隆试验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社
- 施立明. 1990. 遗传多样性及其保护. 生物科学信息, 2(1): 158~164
- Liu P., Kong J., Shi T. *et al.* 2000. RAPD analysis of wild stock of Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Yellow Sea and coastal waters of the Bohai Sea. Acta Oceanologica Sinica, 19(1): 119~126
- Lynch, M., and Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology, 3: 91~99
- Meruane, J., Takagi, M., and Taniguchi, N. 1996. Species identification and genetic variation of three species of *Macrobrachium* (Crustacea: Palaemonidae) by RAPD. Suisanzoshoku, 44(3): 299~305
- Nei, M., and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76(10): 5 269~5 273
- Nei, M. 1972. Genetic distance between population. Am. Nat. 106: 283~292
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Llivak, K. J. *et al.* 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res. 18: 6 531~6 535