

不同地理群体星突江鲽养殖子一代群体遗传多样性分析

马爱军¹ 李晨^{1,2} 王新安¹ 侯仕营¹

(¹ 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 上海海洋大学, 201306)

摘要 采用 RAPD 标记技术对取自韩国沿海和俄罗斯沿海的星突江鲽养殖子一代进行了遗传多样性分析。从 40 个 10bp 随机引物中筛选出 11 个效果稳定的引物, 对每个群体 40 个个体进行扩增, 各获得 57 个位点。韩国群体多态位点数为 33 个, 其多态位点比例 P 为 57.89%; 俄罗斯群体多态位点数为 32 个, 其多态位点比例 P 为 56.14%。韩国群体和俄罗斯群体的 Shannon 遗传多样性分别为 0.338 4 和 0.296 3, Nei 的多样性指数 h 分别为 0.230 5 和 0.194 7。星突江鲽两群体遗传多态度总量 H_{sp} 为 0.425 2。其中, 群体内遗传多态度 H_{pop} 为 0.317 4, 源于群体内的遗传多样性的比例为 0.746 5, 而源于群体间的遗传多样性的比例为 0.253 5。

关键词 星突江鲽 遗传多样性 养殖群体

中图分类号 Q347; Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)05-0001-05

Genetic diversity analysis of the first filial generation of different cultured population of *Platichthys stellatus*

MA Ai-jun¹ LI Chen^{1,2} WANG Xin-an¹ HOU Shi-ying¹

(¹ Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Genetic diversity of the first filial generation of two cultured populations of *Platichthys stellatus* from South Korea (S) and Russia (R) was examined. Eleven from 40 random primers were used for population genetic analysis, and a total of 57 clear RAPD bands ranging from 300 to 2 500 bp were recognized. The numbers of polymorphic bands of S and R populations were 33 and 32, respectively, and the mean percentages of polymorphic bands of them were 57.89% and 56.14%, Nei's diversity index of them were 0.230 5 and 0.194 7, and Shannon information index of them were 0.338 4 and 0.296 3. Partitioning analysis of genetic diversity in Shannon index indicated that 74.65% of genetic variation was distributed within populations and 25.35% was between populations.

KEY WORDS Starry flounder *Platichthys stellatus* Genetic diversity Cultured population

国家科技支撑计划(2006BAB03B05)、青岛市科技项目(06-2-3-18-hy)和“泰山学者”建设工程专项经费共同资助

收稿日期:2008-06-20;接受日期:2008-09-25

作者简介:马爱军(1971-),女,研究员,主要从事海水鱼类繁育与遗传育种研究。E-mail: maaj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85835103

星突江鲮 *Platichthys stellatus* Pallas, 属鲮形目 Pleuronectiformes、鲮科 Pleuronectidae、江鲮属 *Platichthys* Girard, 又称星斑川鲮。世界范围内江鲮属鱼类有两种, 一种是分布于北欧沿岸的欧川鲮 (*Platichthys flesus* Linnaeus 1758), 另一种即星突江鲮。星突江鲮是一种分布相对广泛的鲮科鱼类, 北到白令海峡、楚科其海、阿拉斯加和加拿大北极沿岸, 南到北美和南加利福尼亚。我国黑龙江、绥芬河和图们江等河内, 以及日本和朝鲜半岛均有分布(马爱军等 2006)。星突江鲮生长较快, 适广温广盐, 具有很强的环境适应性, 是一种较理想的增殖对象。

我国北方沿海已经形成了以鲮类为主导的海水鱼类养殖产业, 目前养殖的鲮类已达 10 多种。星突江鲮为珍贵的海水鲮类, 2006~2008 年间, 中国水产科学研究院黄海水产研究所开展了其亲鱼培育和苗种培育研究并获得了规模化苗种繁育的成功。关于该鱼种的群体遗传学研究, 国外仅见日本和法国学者等有关其野生群体的遗传多样性研究。国内已从生物化学标记和 DNA 分子标记等方面已开始进行研究(尤 锋等 2007; 李 晨等 2008)。本实验采用 RAPD 标记技术对源自韩国沿海和俄罗斯沿海的星突江鲮的养殖子一代进行了遗传多样性研究, 以期深入了解星突江鲮种质资源的遗传多样性水平, 为目前的星突江鲮增殖和今后的遗传育种提供参考, 最终实现星突江鲮养殖业的健康和可持续发展, 也为保护这一珍贵物种做出相应的贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用星突江鲮每个群体各取 40 尾。韩国群体(K)取自黄海水产研究所烟台实验站, 平均体长 6.62 ± 0.86 cm, 平均体重 8.56 ± 2.91 g; 俄罗斯群体(R)取自日照实验站, 平均体长 6.92 ± 0.94 cm, 平均体重 10.33 ± 3.11 g。实验所用随机引物购自上海生物工程技术服务有限公司, 所用 Taq 酶和 dNTP 均购自 BBI, PCR 扩增仪型号为 BIO-RAD PTC-200。从 40 个引物中筛选出扩增结果稳定、条带清晰的 11 条引物。随机引物及其序列如表 1。

1.2 方法

基因组 DNA 的提取参照 Salah 等 (1997) 的方法, 并略作改进。选取 25 μ l 反应体系, 单因素优化法获得最佳反应体系为: $10 \times$ PCR Buffer 2.5 μ l, 模板 DNA 50ng, 5 μ mol/L 的引物 1.00 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2.00 μ l, 1U Taq 酶, 25mmol/L MgCl₂ 2 μ l。RAPD 反应循环参数参考 Williams 等 (1990) 的方法并稍加改动: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5

min 后, 进行 45 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, Genefinder 染色, 凝胶成像系统观察拍照(刘亚军等 2006)。

1.3 数据统计分析

RAPD 数据的统计和分析参考季维智等(1996)的方法, 每一样品的扩增情况按扩增条带的有或无记录, 出现扩增条带记录为 1, 无扩增条带记录为 0, 列出 0、1 矩阵, 采用 Poppene 软件(Yeh *et al.* 1997)进行统计分析。每条扩增带看作一个位点, 统计扩增位点总数、多态位点数以及多态位点比例数。

1.3.1 多态位点比例 P

$$P = \frac{\text{某群体的多态位点数}}{\text{总的位点数}} \times 100\%$$

表 1 随机引物及其序列

Table 1 Primers and their sequences

引物 Primer	碱基序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物 Primer	碱基序列(5'-3') Sequence(5'-3')
S3	CATCCCCCTG	S21	CAGGCCCTTC
S5	TGCGCCCTTC	S30	GTGATCGCAG
S6	TGCTCTGCC	S31	CAAGCGCCGT
S11	GTAGACCCGT	S37	GACCGCTTGT
S13	TTCCCCGCT	S40	GTTGCGATCC
S15	GGAGGGTGT		

1.3.2 遗传多样性指数

目前应用较多的遗传多样性指数有 Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数。

Nei 基因多样性指数 Nei 将总群体的基因多样性(H_T)分解为群体内基因多样性(H_S)和群体间基因多样性(D_{ST})。根据 Nei 的方法,计算群体内和群体间的基因多样性,公式为:

$$H = \sum_{i=1}^m (1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2) / n$$

式中, q_{ij} 为第*i*个位点上第*j*个等位基因的频率, m_i 为第*i*个位点上的等位基因数, n 为检测到的位点总数。
Shannon 信息指数

$$H_o = - \sum \frac{P_i \ln P_i}{N}$$

式中, P_i 为某一位点在某一群体中出现的频率; N 为在该群体中检测到的总位点数。 H_o 可用来分析和比较群体的遗传多样性。 H_{sp} 是群体内平均多样性的测度, H_p 是种内多样性的测度。 H_{sp}/H_p 是群体内多样性所占的比例, $(H_p - H_{sp})/H_p$ 是群体间多样性所占比例。

$$H_{sp} = \frac{\sum H_s}{n}, H_p = - \sum \frac{P \ln P}{N}$$

式中, n 为所研究的群体数; P 为某一位点在整个群体中出现的频率。然后通过 H_{sp}/H_p 和 $(H_p - H_{sp})/H_p$ 的值来比较和衡量遗传多样性的来源(群体内或群体间)。

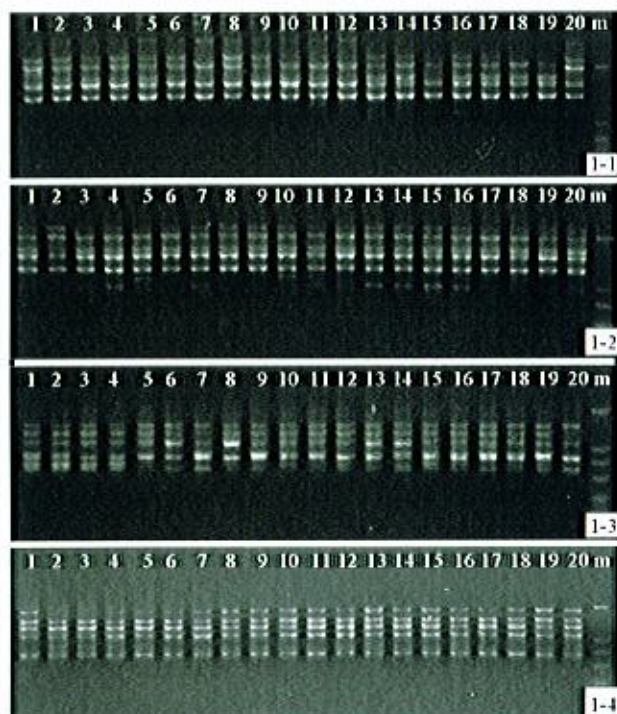
2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

利用筛选出的 11 个重复性好、多态性好,且扩增条带清晰的引物对两个群体的 40 个个体进行扩增,共扩增出 57 条带,片段大小在 300~2 500bp 之间。其中,韩国群体 57 个位点中多态位点数为 33 个,其多态位点比例 P 为 57.89%;俄罗斯群体 57 个位点中多态位点数为 32 个,其多态位点比例 P 为 56.14%。图 1 为引物 S31 和 S40 对两个群体部分个体扩增结果的电泳图谱。

2.2 遗传多样性分析

遗传多样性指数统计结果如表 2 显示。韩国群体(K)的 Shannon 遗传多样度为 0.338 4,俄罗斯群体(R)的 Shannon 遗传多样度为 0.296 3;韩国群体的 Nei 的多样性指数 h 为 0.230 5,俄罗斯群体的 Nei 的多样性指数 h 为 0.194 7。星突江鳎遗传多态度总量 H_p 为 0.425 2,种群内遗传多态度 H_{sp} 为 0.317 4。源于群体内的遗传多样性的比例为 0.746 5,而源于群体间的遗传多样性的比例为 0.253 5,表明 74.65% 的遗传多样性是由群体内不同个体间的差异造成的,25.35% 的遗传多样性与群体间的遗传分化有关。



1-1 引物 S31 韩国;1-2 引物 S31 俄罗斯;1-3 引物 S40 韩国;
1-4 引物 S40 俄罗斯;分子标记(DL2000)
1-1 31 primer S;1-2 31 primer R;1-3 40 primer S;
1-4 S40 primer R;m:marker(DL2000)

图 1 韩国和俄罗斯养殖子一代群体 RAPD 的电泳图谱
Fig. 1 RAPD electrophoregram in F1 cultured stock of South Korea(S)and Russia(R)origin

表2 星突江鲮不同群体内及群体间遗传多样性参数

Table 2 Genetic diversity parameters within and among populations of *Platyichthys stellatus*

引物 Primer	H_0		H_{S2}	H_D	H_{S2}/H_D	$(H_D - H_{S2})/H_D$
	R	K				
S03	0.330 2	0.314 6	0.322 4	0.414 7	0.777 4	0.222 6
S05	0.208 1	0.351 6	0.279 9	0.373 6	0.749 2	0.250 8
S06	0.322 9	0.373 4	0.348 2	0.472 5	0.736 9	0.253 1
S11	0.324 1	0.359 8	0.342 0	0.452 0	0.756 6	0.243 4
S13	0.290 4	0.346 6	0.318 5	0.417 6	0.762 7	0.237 3
S15	0.304 8	0.368 6	0.336 7	0.454 8	0.740 3	0.259 7
S21	0.361 2	0.365 9	0.363 6	0.499 6	0.727 8	0.272 2
S30	0.297 9	0.364 3	0.331 1	0.441 5	0.749 9	0.250 1
S31	0.278 2	0.288 9	0.293 6	0.380 9	0.770 8	0.229 2
S37	0.284 0	0.345 0	0.314 5	0.413 9	0.759 8	0.240 2
S40	0.262 6	0.258 3	0.260 5	0.367 1	0.709 6	0.290 4
平均 Average	0.295 3	0.338 4	0.317 4	0.425 2	0.746 5	0.253 5

3 讨论

3.1 不同地理群体星突江鲮的遗传多样性

早在1975年,美国学者 Johnson 等就对采自太平洋西北部和东北部沿岸的星突江鲮进行了3种同工酶等位基因频率差异的分析比较。日本学者 Fujio 于1977年采用同工酶技术对仙台(Sendai)湾分布的星突江鲮的遗传多样性进行了研究,32个位点中有18个为多态性位点,多态位点比例为56.3%;Park 等于1991年对日本东部沿海瓦塔日地区的星突江鲮群体进行了研究报道。法国学者 Borsa 于1997年同样也用22种同工酶对采自日本沿岸的星突江鲮进行了群体研究,分析了33个基因座位,其遗传多样性指数预期杂合度为0.095。李晨等(2008)采用同工酶技术,对星突江鲮韩国群体进行了9种同工酶20个位点中有5个为多态位点,多态位点比例为25%。

本研究采用 RAPD 标记技术对韩国群体和俄罗斯群体的遗传多样性进行研究,其多态位点比例分别为57.89%和56.14%,可比的韩国群体遗传多样性 RAPD 标记技术明显高于相应的同工酶标记技术。更多的研究表明,与同工酶标记相比,RAPD 标记的多态性水平更高。You 等(2007)同时采用同工酶标记和 RAPD 标记,分别对养殖群体和自然群体牙鲆的遗传多样性进行了研究,其结果显示两个群体的同工酶遗传多样性水平均低于 RAPD 多样性水平。李明云等(2005)对山东日照和福建厦门沿海花鲈的遗传多样性水平进行了研究,采用同工酶标记所得遗传多样性为21.1%,采用 RAPD 标记所得遗传多样性为24.08%。谭树华等(2005)等研究了斑节对虾养殖群体的遗传多样性,同工酶多态位点比例为61.90%,RAPD 多态位点比例为81.93%。由此可见,同工酶检测的群体遗传多样性水平普遍低于 RAPD 所得的结果。造成这种结果的原因有很多。首先,同工酶技术有不少优点,如杂合体共显性,可以不用人工杂交就迅速地确定亲本来源关系,探测物种隐藏的变异,其遗传和表达遵循孟德尔定律,便于遗传学分析等。但同时,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态的影响,同时同工酶所能分析的位点比较有限(王中仁 1998),而 RAPD 技术虽不能区分显、隐性基因,但它能克服同工酶技术中上述的缺陷,提供更多的位点信息,因此将二者结合起来进行群体遗传多样性分析,能较可靠地反映整个基因组的实际情况。

本研究俄罗斯养殖子一代群体 Nei 遗传多样性指数为0.1947,多态位点比例为56.14%。尤锋(2007)等通过 RAPD 分析了其养殖群体18个随机引物的 PCR 产物,其扩增谱带数达到了133个,其 Nei 遗传多样性

指数为 0.316 6, 多态位点比例为 62.11%, 多样性指数和多态位点比例均高于本研究。造成上述差别的原因可能有两个:(1)所选引物的不同。不同的引物多态性差别较大。(2)取样的不同。本实验取样虽都为养殖子一代群体,但星突江鲮在增养殖过程中并不是所有的亲本同时产卵和产精子,而有可能是某几尾在某一时间段集中产卵和产精子,其子一代遗传多样性水平难免会有所差异。本实验中,韩国群体无论是多态位点比例,还是 Shannon 遗传多样性和 Nei 的多样性指数,都高于俄罗斯群体,分析其原因为韩国群体的亲本均为捕获驯化的野生群体。在分析我国目前星突江鲮群体遗传多样性时,应了解综合已有的研究背景和数据进行分析。

3.2 星突江鲮种质资源保护

目前我国北方已形成了鲆鲽类为主体的海水鱼类养殖,星突江鲮为珍贵的海水鲆鲽鱼类,其亲鱼培育和苗种繁育研究大大地丰富了鲆鲽鱼类的养殖品种。尽管与其他鲆鲽鱼类相比其遗传多样性较高,如徐冬冬等(2008)研究的条斑星鲽群体多态位点比例为 26.02%。Nei 遗传多样性指数和 Shannon 遗传多样性指数分别为 0.110 1 和 0.158 7;黎中宝等(2004)分析我国牙鲆养殖群体的多态位点变化为 14.29%~23.81%。但同时我们也注意到,目前我国的星突江鲮两个群体均为引进的群体,尽管据历史记载在我国境内黑龙江、绥芬河和图们江等河内也有星突江鲮分布,但目前并未有捕获记录,说明我国境内的星突江鲮种质资源不容乐观。建议加强星突江鲮未来养殖中亲本群体的遗传管理,对其繁育的规划应尽早实施,切实维持育苗亲本的适当大小,制定交配方案,及时引进补充野生群体,避免近亲交配和累代养殖,并进行必要的提纯复壮工作等科学的遗传措施,防止种质衰退。同时在苗种繁育成功的基础上可考虑在我国沿海开展星突江鲮增殖放流活动,恢复星突江鲮种群规模,以保护这一珍贵物种,促进我国海水鱼类养殖事业的可持续发展。

参 考 文 献

- 马爱军,庄志猛,李 晨. 2006. 星突江鲮生物学特征及养殖前景. 海洋水产研究, 27(5):91~95
- 尤 锋,吴志昊,李 军. 2007. 星斑川鲽(*Platichthys stellatus*)养殖群体的 RAPD 分析. 海洋科学进展, 25(1):73~78
- 王中仁. 1998. 植物等位酶分析. 北京:科学出版社
- 李 晨,马爱军. 2008. 星突江鲮同工酶的遗传多样性研究. 海洋水产研究, 29(4):1~6
- 李明云,赵明忠,钟爱华,薛良义. 2005. 山东日照和福建厦门沿海花鲈遗传差异的同工酶和 RAPD 分析. 海洋学报, 27(3):119~123
- 刘亚军,孔晓瑜,喻子牛. 2006. 栉孔扇贝自然群体遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋与湖沼, 37(4):289~295
- 季维智,宿 兵. 1996. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州:浙江科学技术出版社,132~134
- 徐冬冬,尤 锋,李 军. 2008. 3 种鲆鲽鱼养殖群体的遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究. 高技术通讯, 18(2):216~220
- 谭树华,王桂忠,艾春香. 2005. 斑节对虾养殖群体遗传多样性的同工酶和 RAPD 分析. 中国水产科学, 12(6):702~707
- 黎中宝. 2004. 牙鲆养殖群体遗传结构的研究. 海洋学报, 26(3):102~108
- Borsa, P., Blanquer, A., and Berrebi, P. 1997. Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology*, 129: 233~246
- Fujio, Y. 1977. Natural hybridization between *Platichthys stellatus* and *Kareius bicoloratus*. *Japan. J. Genetics*, 52(2):117~124
- Johnson, A. G., and Beardsley, A. J. 1975. Biochemical polymorphism of starry flounder, *Platichthys stellatus*, from the northwestern and northeastern Pacific Ocean. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 6(1):9~18
- Nei, M., and Kumar, S. 2002. 分子进化与系统发育 (Molecular evolution and phylogenetics. 吕宝忠等 译). 北京:高等教育出版社,250~254
- Park, J. Y., and Kikima, A. 1991. Genetic variability and differentiation within and between the stone flounder (*Kareius bicoloratus*) and the starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 41(3-4): 69~82
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6 531~6 535
- Yen, F. C., and Boyle, T. J. B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129 ~157
- You, F., Zhang, P. J., Wang, K. L., and Xiang, J. H. 2007 Genetic variation of natural and cultured stocks of *Paralichthys olivaceus* by allozyme and RAPD. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 25(1):78~84