

RAPD 对圆斑星鲷和条斑星鲷养殖群体的遗传多样性研究

杨 奔^{1,2}, 尤 锋¹, 李 军¹, 徐冬冬¹, 吴志昊¹, 于道德¹, 倪 静¹, 徐世宏¹, 徐永立¹, 张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 哈尔滨工业大学(威海), 山东 威海 264209)

摘要:应用 RAPD 分子标记技术对圆斑星鲷(*Verasper variegatus*)和条斑星鲷(*Verasper moseri*)的养殖群体进行群体遗传多样性分析。每个群体各取鱼 30 尾, 并从 78 条随机引物中筛选出 20 条用于群体遗传学研究。两个群体共扩增出 218 条 DNA 片段, 大多数片段大小为 250~1 500 bp, 其中圆斑星鲷 185 条, 条斑星鲷 183 条。多态片段比例分别为 56.76% 和 64.48%, Nei 的多样性指数和 Shannon 的信息指数分别为 0.232 2 和 0.278 1、0.339 1 和 0.398 9。这两种星鲷养殖群体间的遗传相似性系数和遗传距离分别为 0.672 0 和 0.397 5。

关键词:圆斑星鲷(*Verasper variegatus*); 条斑星鲷(*Verasper moseri*); 养殖群体; RAPD; 遗传多样性
中图分类号:Q321.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2009)08-0026-04

圆斑星鲷(*Verasper variegatus*)和条斑星鲷(*Verasper moseri*)均隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲷形目(Pleuronectiformes)、鲷科(Pleuronectidae)、星鲷属(*Verasper*)^[1]。圆斑星鲷俗名花鲷, 在黄、渤海较常见, 朝鲜半岛及日本中部沿海也有分布, 其肉味鲜美, 属高档商品鱼类^[2]; 近年来正在开展工厂化繁殖育苗研究和生产。条斑星鲷主要分布于日本茨城县以北到鄂霍茨克海以南海域, 中国黄、渤海也有零星分布^[3]。该鱼肉质鲜美, 营养丰富, 在日本市场的售价高于牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)一倍左右, 属名贵品种。中国自 2004 年起从日本引进了条斑星鲷鱼苗, 并培育成功, 目前已突破了条斑星鲷的规模化全人工繁殖和育苗^[4]。

有关两种星鲷鱼类遗传多样性研究的报道较少, 而且也都集中在自然群体。日本学者 Fujio 等^[5]于 1979 年对日本仙台近海的圆斑星鲷群体进行了同工酶分析, Romo 等^[6]于 2006 年应用微卫星标记技术分析了这两种星鲷鱼类自然群体的遗传多样性。国内则仅见对圆斑星鲷和条斑星鲷个体线粒体 DNA 部分片段序列的比较研究^[7]以及圆斑星鲷黄海群体生化遗传结构的报道^[8]。

作者运用 RAPD 技术, 从 DNA 水平上对圆斑星鲷和条斑星鲷养殖群体的遗传多样性进行研究, 以期了解其遗传多样性背景、群体内和群体间遗传分化水平, 为其生物资源的种质保存、遗传改良及进一步的开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和 DNA 的提取

圆斑星鲷养殖群体样本 30 尾(平均全长 60.1 mm±8.1 mm), 于 2006 年 9 月取自连山岛金源公司养鱼场, 均为冰鲜个体; 条斑星鲷养殖群体样本 30 尾(平均全长 229.3 mm±11.1 mm), 于 2005 年 5 月, 取自烟台东方海洋水产公司养鱼场, 为日本引进的养殖群体, 均为冰鲜个体; 所有样品取其肌肉组织立即置于-20℃下保存备用。样品总 DNA 的提取参照汪永庆^[9]的高盐法, 获得的总 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, Beckman DU-650 型紫外分光光度计测定浓度, 并稀释到一定浓度后, -20℃下保存备用。

1.2 随机引物的筛选及 RAPD 分析

PCR 反应体系为 25 μL, 其反应体系、PCR 程序和电泳检测方法等详见参考文献^[10]。通过 PCR, 以扩增产物条带的有无、强弱、个体内一致性等为标准对 78 条 10 个碱基的随机引物(购自上海生工生物工程技术有限公司)进行筛选, 最终选择扩增片段清晰、个体内一致性强、重复性高的引物用于群体分析。

收稿日期: 2007-10-05; 修回日期: 2009-04-01

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA10A404); 国家科技部水产种质资源整理、整合与共享种质平台项目(2006DKA30470-017)

作者简介: 杨奔(1985-), 男, 浙江温州人, 学士, 研究方向: 鱼类群体遗传学; 尤锋, 通信作者, E-mail: youfeng@ms.qdio.ac.cn

1.3 数据统计和分析

根据 RAPD 的产物电泳图谱进行分析,在电泳条带中相同的迁移位置,将 DNA 片段的有和无定义为 1 和 0,仅记录清晰且重复性好的条带,所有数据统计后形成矩阵。将相同迁移距离的条带看作 1 个片段,统计片段总数及多态片段数,计算多态片段的比例(P):多态片段比例(P)=多态片段数/片段总数 $\times 100\%$ 。采用软件 POPGENE VERSION 1.31^[11] 计算了 Nei 基因多样性指数和 Shannon 遗传多样性指数,并进一步获得遗传相似性指数和遗传距离。

2 实验结果

2.1 随机引物的筛选及扩增结果

经过筛选,78 条随机引物中有 20 条随机引物能够得到清晰、稳定和可重复的扩增片段,被用于群体的遗传变异实验(表 1);其余 58 条引物的扩增图谱不是很清晰或重复性差,而未被选做群体分析。两种星鲃养殖群体共扩增出 218 条片段,其中圆斑星鲃养殖群体和条斑星鲃养殖群体的扩增片段数分别为 185 条和 183 条,片段大小为 200~2 000 bp,大多数片段分布在 250~1 500 bp。每条引物扩增的片段

数为 4~18 条,平均为 11 条。两个群体的扩增图谱见图 1。

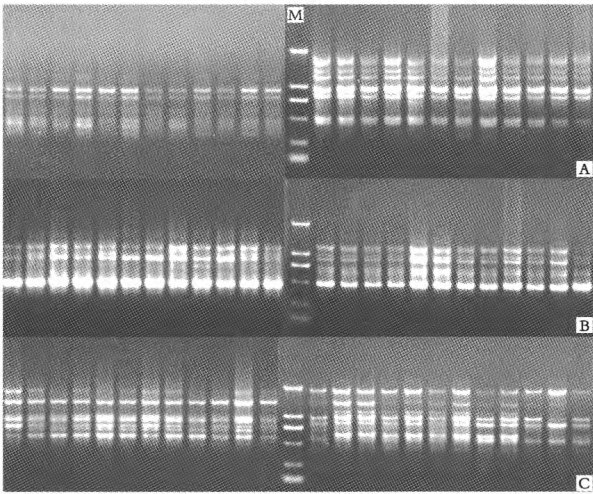


图 1 圆斑星鲃(左)和条斑星鲃(右)养殖群体 RAPD 扩增图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of RAPD markers amplified from *Varasper variegatus* (left) and *Varasper moseri* (right) cultured stocks

M. DL 2000 标记; A. S69 引物扩增图谱; B. S194 引物扩增图谱; C. S189 引物扩增图谱
M. DL 2000 marker; A-C. RAPD electrophoregrams generated by S69, S194 and S189 primers

表 1 圆斑星鲃、条斑星鲃养殖群体分析的 RAPD 引物序列及扩增结果

Tab.1 Sequences and amplified results of RAPD random primers from cultured stocks of *V. variegatus* and *V. moseri*

引物 代码	引物序列 (5'-3')	总扩增片 段数(条)	圆斑星鲃 特有片段 数(条)	条斑星鲃 特有片段 数(条)	引物 代码	引物序列 (5'-3')	总扩增片 段数(条)	圆斑星鲃 特有片段 数(条)	条斑星鲃 特有片段 数(条)
S1	GTTTCGCTCC	12	2	2	S156	GGTGACTGTG	11	0	3
S27	GAAACGGGTG	13	1	5	S165	TGTTCCACGG	10	3	2
S69	CTCACCGTCC	11	0	3	S171	ACATGCCGTG	4	0	0
S77	TTCCCCCAG	18	3	2	S172	AGAGGGCACA	13	5	1
S85	CTGAGACGGA	15	3	5	S173	CTGGGGCTGA	10	2	0
S89	CTGACGTCAC	14	2	1	S187	TCCGATGCTG	16	7	4
S90	AGGGCCGTCT	13	1	1	S189	TCCTGGTCCC	10	2	1
S94	GGATGAGACC	7	1	1	S192	CTGGGTGAGT	9	2	0
S133	GGCTGCAGAA	10	0	2	S196	AGGGGGTTCC	6	0	0
S134	TGCTGCAGGT	10	2	0	S199	GAGTCAGCAG	6	0	0

2.2 群体遗传变异分析

圆斑星鲃、条斑星鲃养殖群体内的相关遗传参数统计结果见表 2,Nei 的多样性指数和 Shannon 的信息指数均表明圆斑星鲃养殖群体的遗传多样性水

平略低于条斑星鲃养殖群体。

群体间的相关遗传参数统计结果,Nei 和 Shannon 的多样性指数都显示群体内的遗传变异占优势,分别占 73.02%和 66.92%。

表 2 圆斑星鲷和条斑星鲷养殖群体的 RAPD 片段数和遗传多样性指数

Tab. 2 The number of RAPD band and genetic diversity for cultured stocks of *V. variegatus* and *V. moseri*

养殖群体名称	总片段数 (条)	多态片段数 (条)	多态片段比例 (%)	Nei 的多样性指数	Shannon 的信息指数
圆斑星鲷(<i>V. variegatus</i>)	185	105	56.76	0.232 2	0.339 1
条斑星鲷(<i>V. moseri</i>)	183	118	64.48	0.278 1	0.398 9

2.3 群体间的遗传距离分析

根据 Nei 的非偏差方法计算的圆斑和条斑星鲷养殖群体间的遗传相似性系数和遗传距离分别为 0.672 0 和 0.397 5。

3 讨论

3.1 圆斑星鲷和条斑星鲷养殖群体的遗传多样性水平

本研究圆斑星鲷和条斑星鲷养殖群体遗传多样性参数的相应数值分别为 56.76% 和 64.48%、0.232 2 和 0.278 1、0.339 1 和 0.398 9。两种鱼的养殖群体相比,圆斑星鲷的遗传参数数值均低于条斑星鲷的,这可能是作者所分析的圆斑星鲷养殖群体的亲本数量较小,亲缘关系较近所致,而由日本引进的条斑星鲷养殖群体可能保证了一定的亲本数量。将其与以往半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)^[12]和漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[13]养殖群体的 RAPD 分析结果相比较,两群体的数值也偏低。但又比牙鲆^[14]和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[15]的养殖群体的遗传参数高。

日本学者 Romo 等^[6]曾于 2006 年采用微卫星标记对日本近海 4 个不同海域的圆斑星鲷野生群体和北海道附近海域的条斑星鲷野生群体进行了分析,圆斑星鲷的平均观测杂合度和预期杂合度分别为 0.742 和 0.750,条斑星鲷的值为 0.848 和 0.860,该学者认为均具有相对较高的遗传变异水平。而 Liu 等^[8]于 2005 年采用同工酶标记对黄海北部的圆斑星鲷野生群体的分析结果显示,圆斑星鲷野生群体的多态片段比例、平均观测杂合度和预期杂合度分别为 0.450 0($P \leq 0.99$)、0.027 8 和 0.026 5,与其他海水鱼类相比,Liu 认为黄海北部的圆斑星鲷群体遗传多样性水平较低,这一结果与 Romo 的研究有所不同,作者认为,其原因可能是同工酶分析群体基因座位有限(Liu 共纪录了 20 个基因座位,其中 9 个为多态座位),其灵敏度不如微卫星高。尽管两位学者和作者所使用的分析方法均不同,但粗略比较起来,日本近海圆斑星鲷野生群体其遗传多样性水平较黄海群体要高,而本实验山东圆斑星鲷养殖群体和日本条斑星鲷养殖群体的遗传多样性水平均较

低。因此,在今后的两种星鲷鱼的繁殖育苗生产中,应加强圆斑星鲷和条斑星鲷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、定期更换亲鱼、避免累代养殖,进行必要的提纯复壮等科学的遗传管理,确保其养殖健康和可持续发展。

3.2 圆斑星鲷和条斑星鲷的亲缘关系

RAPD 标记在检测群体的遗传变异时就比较灵敏,在种间的差异就更大,一般同一引物在不同种的扩增产物是不相同的。圆斑星鲷和条斑星鲷为同属不同种鱼类,本研究结果却显示,这两种星鲷鱼类养殖群体的 RAPD 的扩增结果如表 1 和图 1 所示有很多引物的图谱是比较相似的。分析的 20 条引物中,有 9 条的扩增图谱在两个群体中基本相同;有 6 条引物,两群体的扩增图谱很类似;仅 5 条引物,两群体的扩增图谱存在较明显的差异。Nei 的多样性指数和 Shannon 的信息指数也表明这两种星鲷鱼类养殖群体间的基因分化系数较小为 0.376 9,它们的遗传变异也以群体内也就是种间的遗传变异为主。Nei 的非偏差方法计算结果显示了两个星鲷养殖群体的遗传距离较小(0.397 5),可以看出这两种星鲷鱼类的亲缘关系较近。高天翔等^[7]对圆斑星鲷和条斑星鲷线粒体基因组 16SrRNA,COI,ND5,Cytb 部分序列的比较研究也表明了这两种星鲷间遗传关系非常近,分歧时间 270 万~430 万 a,分化时间发生在上新世。但是如果要进一步明确两者的亲缘关系,作者认为有必要对其线粒体 DNA 全基因组序列进行深入的研究。

参考文献:

- [1] 孟庆闻,苏锦祥,缪学祖. 鱼类分类学 [M]. 北京:中国农业出版社,1995. 962-963.
- [2] 陈四清,于东祥,马爱军,等. 圆斑星鲷 *Verasper variegatus* 生物学特性研究 [J]. 现代渔业信息,2002,17(10): 25-27.
- [3] 李思忠,王惠民. 中国动物志:硬骨鱼纲-鲷形目 [M]. 北京:科学出版社,1995. 233-237.
- [4] 李文姬,李华琳. 日本条斑星鲷的生物学及增养殖概况 [J]. 水产科学,2006,25(10): 533-536.
- [5] Fujio Y, Kato Y. Genetic in fish population [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1979,

- 45(9): 1 169-1 178.
- [6] Ortega-Villaizan Romo M D M, Masato Aritaki M, Suzuki S, *et al.* Genetic population evaluation of two closely related flatfish species, the rare barfin flounder and spotted halibut, along the Japanese coast [J]. *Fisheries Science*, 2006, 72: 556-567.
- [7] 高天翔, 陈四清, 刘进贤, 等. 圆斑星鲽与条斑星鲽线粒体 DNA 部分片段的序列比较研究 [J]. 高技术通讯, 2004, 14(增刊): 329-334.
- [8] Liu M, Gao T, Zhang X, *et al.* Isozyme analysis of spotted halibut *Verasper variegatus* Temminck *et* Schlegel [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2005, 4(1): 43-48.
- [9] 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.
- [10] 杨奔, 尤锋, 王波, 等. 半滑舌鳎和塞内加尔鳎养殖群体遗传变异的 RAPD 分析 [J]. 海洋科学进展, 2008, 26(4): 506-511.
- [11] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [CP]. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999.
- [12] 韩志强, 庄志猛, 高天翔, 等. 半滑舌鳎 DNA 的群体遗传变异 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 192-200.
- [13] 尤锋, 吴志昊, 王伟, 等. 漠斑牙鲆养殖群体 RAPD 遗传多样性的初步分析 [J]. 海洋科学, 2006, 30(2): 86-90.
- [14] You F, Zhang P, Wang K, *et al.* Genetic variation of natural and cultured stocks of *Paralichthys olivaceus* by allozyme and RAPD [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2007, 25(1): 78-84.
- [15] 申雪艳, 宫庆礼, 雷霖霖, 等. 进口大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 332-341.

Study on genetic diversities in *Verasper variegatus* and *Verasper moseri* cultured stocks using RAPD analysis

YANG Ben^{1,2}, YOU Feng¹, LI Jun¹, XU Dong-dong¹, WU Zhi-hao¹, YU Dao-de¹, NI Jing¹, XU Shi-hong¹, XU Yong-li¹, ZHANG Pei-jun¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Harbin Institute of Technology(Weihai), Weihai 264209, China)

Received: Oct., 5, 2007

Key words: *Verasper variegatus*; *Verasper moseri*; cultured stock; RAPD; genetic diversity

Abstract: The RAPD molecular technology was used to analyze the genetic diversities of cultured stocks of spotted halibut, *Verasper variegatus* and barfin flounder, *Verasper moseri*. Out of 78, 20 arbitrary oligonucleotide primers were screened and for PCR amplification for stock genetics analysis. Total 218 bands were amplified, 185 in spotted halibut and 183 in barfin flounder, most ranging from 250 to 1 500 bp. The percentage values of polymorphic bands of these two stocks were 56.76% and 64.48%, and their Nei's genetic diversity values were 0.232 2 and 0.278 1, respectively. Their Shannon indexes were 0.339 1 and 0.398 9, respectively. Nei's genetic identity and genetic distance between these two *Verasper* cultured stocks were 0.672 0 and 0.397 5, respectively.

(本文编辑: 谭雪静)