

## 约氏笛鲷自然群体遗传多样性的 RAPD 分析

易乐飞, 刘楚吾, 吕立强

(湛江海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 约氏笛鲷 (*Lutjanus johni*) 样品 10 尾, 取自湛江近海自然种群。从 120 个随机引物中筛选出 16 个引物, 采用 RAPD 技术对其进行分析。结果表明, 16 个引物共检测到 215 个位点, 其中多态位点比例 ( $P$ ) 为 78.60%, 遗传相似系数 ( $S$ ) 为 0.727 0, 遗传距离 ( $D$ ) 为 0.273 0, 遗传多样性指数 ( $H$ ) 为 0.208 5。目前湛江近海约氏笛鲷自然群体种质资源仍然维持在良好水平, 捕捞尚未对其造成明显影响。

**关键词:** 约氏笛鲷; 自然群体; RAPD; 遗传多样性

**中图分类号:** S941.42

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737(2002)04-0379-03

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 技术目前已被广泛地应用于种质鉴定、亲缘关系及系统分类研究中<sup>[1-6]</sup>。但有关海水鱼类 RAPD 研究报道较少。

约氏笛鲷 (*Lutjanus johni* Bloch) 属于鲈形目 (Perciformes)、笛鲷科 (Lutjanidae)、笛鲷属 (*Lutjanus*)<sup>[7]</sup>, 具有分布广、生长快、个体大和肉质鲜美等特点, 是我国南方海水捕捞的重要对象之一<sup>[8]</sup>。但对约氏笛鲷的基础研究尚少, 本文采用 RAPD 技术对湛江近海约氏笛鲷自然种群的遗传多样性进行研究, 以期对约氏笛鲷的资源保护、遗传改良及进一步开发利用提供理论依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料来源

2001 年 4、5 月分批在湛江近海采集鲜活的约氏笛鲷 (*L. johni*) 样本 10 尾, 依据《南海鱼类志》<sup>[7]</sup> 进行形态分类学鉴定。用注射器从尾静脉抽取血液, 加 ACD(4.8 g/L 柠檬酸、13.2 g/L 柠檬酸钠、14.7 g/L 右旋葡萄糖) 抗凝, -20℃ 保存备用。

#### 2.2 试剂和仪器

所用随机引物为美国 Operon Technologies 公司产品, TaqDNA 聚合酶及其配套试剂、dNTPs、PCR Markers 等为 Pharmacia 公司产品, PCR 扩增仪为 Hema 480。

收稿日期: 2001-09-10。

基金项目: 广东省重大科技兴海项目资助 (A200099A01); 湛江市科技攻关项目资助 ([2000]121-17)。

作者简介: 易乐飞 (1975-), 男, 硕士研究生, 从事繁殖生物学研究。

通讯作者: 刘楚吾, E-mail: swyjs@zjou.edu.cn

#### 1.3 基因组 DNA 的制备

冷冻血液室温融解后, 取 100  $\mu$ L 于 Eppendorf 管中, 用生理盐水漂洗, 离心收集细胞沉淀; 向沉淀中加入 50  $\mu$ L 生理盐水, 悬浮沉淀; 向悬液中加入 DNA 提取裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 5 g/L SDS, pH 8.0) 450  $\mu$ L, 再加蛋白酶 K 至终质量浓度 100  $\mu$ g/mL, 轻柔混匀, 于 55℃ 温度下水浴 3 h; 然后用 1 倍体积苯酚/氯仿 (体积比 1:1)、氯仿各抽提 1 次; 取上清液, 加 2 倍体积无水乙醇沉淀, 挑出 DNA 絮状沉淀, 70% 乙醇洗涤, 室温干燥, 最后溶解于适量 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中, 并用紫外分光光度计定量。

#### 1.4 RAPD 反应条件及结果检查

参照 Williams 等<sup>[2]</sup> 提供的 RAPD 反应条件稍作改动, 扩增反应在 25  $\mu$ L 体积中进行, 其中含 50 mmol/L KCl、10 mmol/L Tris-HCl、2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 g/L Triton X-100、0.2 mmol/L dNTP、15 ng 引物、20 ng 核 DNA、1.5 U TaqDNA 聚合酶、反应液上覆以 25  $\mu$ L 矿物油, PCR 反应过程依次为: 94℃ 预变性 200 s, 然后进入循环扩增, 每循环包括 94℃ 变性 20 s, 36℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 70 s, 经 40 个循环后再在 72℃ 延伸 5 min。每个引物都设立 1 个空白对照组。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5  $\mu$ g/mL EB) 中电泳, 电压 5 V/cm, 电泳结束后置紫外分析仪中观察并拍照。

#### 1.5 数据处理

(1) 依据 RAPD 产物的电泳带型进行分析, 仅记录清晰且重复性好的条带, 将相同迁移距离的条带看作同 1 位点, 统计位点总数, 多态位点数, 计算多态位点比例 ( $P$  为群体的多态位点数除以位点总数乘 100%)。

(2) 参照 Lynch<sup>[9]</sup> 的方法计算个体间的遗传相似系数,

$S_{XY} = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$ , 式中:  $N_{XY}$  为 2 个个体 X 和 Y 共享 RAPD 条带数,  $N_X$  和  $N_Y$  分别为 2 个个体拥有的 RAPD 条带数。遗传距离  $D_{XY} = 1 - S_{XY}$ 。

(3) 参照 Wachira 等<sup>[10]</sup>的公式计算群体的遗传多样性指数,  $H = -\sum X_i \ln X_i / n$ , 其中  $X_i$  为某一位点在某一群体中出现的频率,  $n$  为此群体检测到的位点总数。

## 2 结果

### 2.1 约氏笛鲷 RAPD 分析结果

本研究使用了 OPC、OPF、OPP、OPV、OPY 和 OPZ 共 6 个系列 120 个 10 bp 核苷酸单链引物。依照扩增谱带清晰、带型适中和重复性好等标准对这 120 个引物进行筛选。其中 12 个引物无扩增结果, 其余的引物中, 大部分引物扩增结果过于复杂或简单, 没有选用, 最后筛选出 16 个引物(表 1)用于群体扩增。扩增出的 DNA 条带数目从 3 到 15 条, 平均每个引物在每个个体上产生 8.5 条带, 图 1 示引物 OPY16、OPP11 和 OPC20 扩增产物的电泳图。

表 1 16 个引物的 DNA 序列和扩增效果

Table 1 Sequences and amplified efficiency with 16 primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	扩增带数 Nos. of bands	共有带数 Nos. of shared bands	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	扩增带数 Nos. of bands	共有带数 Nos. of shared bands
OPC20	ACTTCGCCAC	5-9	2	OPY13	GGAGTGCTTC	5-10	1
OPF05	CCGAATTCCC	8-14	3	OPY09	AGCAGCGCAC	9-12	5
OPF06	GGGAATTGGG	3-5	0	OPY10	CAAACGTTGG	8-13	2
OPF10	GGAAGCTTGG	3-10	1	OPY11	AGACGATGGG	11-15	5
OPP03	CTGATACGCC	7-9	0	OPY16	GGGCCAATGT	11-13	10
OPP04	GTGTCTCAGG	4-10	1	OPZ03	CAGCACCGCA	10-13	4
OPP08	ACATCGCCCA	5-7	4	OPZ10	CCGACAAACC	7-9	4
OPP11	AACGCGTCGG	3-6	3	OPZ14	TCGGAGGTTC	7-11	1

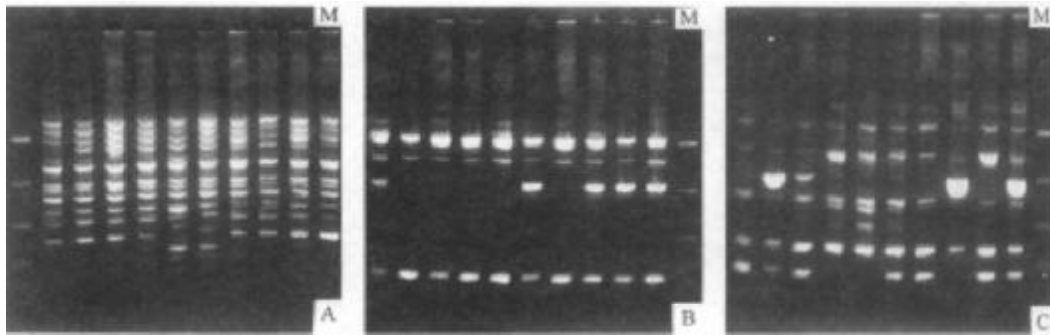


图 1 引物 OPY16、OPP11 和 OPC20 的扩增图谱

Fig. 1 Amplification profiles generated by primers OPY16, OPP11 & OPC20

A—Primer OPY16; B—Primer OPP11; C—Primer OPC20; M—分子质量标准 PCR Markers.

### 2.2 约氏笛鲷遗传多样性

16 个引物共检测出 215 个位点, 其中 169 个位点表现出多态性, 多态位点比例 ( $P$ ) 为 78.60%。2 个体间遗传相似系数 ( $S$ ) 最大为 1.000 0, 最小为 0.582 1, 平均为 0.727 0, 个体间的遗传距离 ( $D$ ) 最大为 0.417 9, 最小为 0, 平均为 0.273 0。将单态位点考虑进去, 遗传多样性指数 ( $H$ ) 为 0.208 5。

## 3 讨论

### 3.1 约氏笛鲷遗传多样性分析

张四明等<sup>[11]</sup>认为, 在 RAPD 研究中使用香农遗传多样性指数 (Shannon's index of phenotypic diversity), 必须像蛋白质分析一样把所测得的位点总数考虑进去, 更客观地反映遗传多样性的本质。因此本研究使用了改进后的遗传多样性指数对约氏笛鲷遗传多样性进行分析。将实验结果与条纹鲈、中华鲟和梭鱼等其他鱼类 RAPD 研究结果进行横向比较。Bielawski 等<sup>[12]</sup>对条纹鲈 (*Morone saxatilis*) 进行了 RAPD 研究, 发现多态位点比例 ( $P$ ) 为 49.06%, 并指出大西洋沿岸条纹鲈核基因遗传变异较低。张四明等<sup>[11]</sup>做了中华鲟 (*Acipenser sinensis*) RAPD 及遗传多样性研究, 结果显示多态

位点比例( $P$ )为 11.1%, 遗传距离( $D$ )为 0.027, 遗传多样性指数( $H$ )为 0.034, 结合中华鲟蛋白质电泳的研究结果, 认为中华鲟基因组遗传变异较低。权洁霞等<sup>[13]</sup>进行了梭鱼(*Liza haematocheila*)群体的 RAPD 分析, 多态位点( $P$ )为 83.93% (养殖群体)和 85.91% (野生群体), 遗传多样性指数( $H$ )为 0.212 4 (养殖群体)和 0.227 1 (野生群体), 认为黄河口海域梭鱼遗传多样性比较丰富。本文研究结果显示多态位点( $P$ )为 78.60%, 遗传距离( $D$ )为 0.273 0, 遗传多样性指数( $H$ )为 0.208 5。这一结果说明目前湛江近海约氏笛鲷自然群体的遗传变异较高, 遗传多样性比较丰富, 也说明其遗传多样性没有因为捕捞或其他因素而显著降低。此结果与约氏笛鲷的生活史类型和捕捞状况相适应。依据约氏笛鲷的生态习性以及叶富良等<sup>[14]</sup>的鱼类生活史类型划分方法, 可以推导出约氏笛鲷属于  $r$ -选择, 种群密度高, 性成熟年龄短, 种群繁殖力大, 能承受一定强度的捕捞。目前南海的捕捞强度尚未引起约氏笛鲷种群资源量下降, 其种质资源仍然处于良好水平, 种质没有出现明显的退化。

### 3.2 对今后约氏笛鲷繁育养殖的意义

为了尽可能维持约氏笛鲷遗传变异水平, 维持种群的自然繁殖能力, 以及生物资源的可持续利用, 结合湛江近海海域约氏笛鲷现存资源情况, 应该采取就地保护的策略。在生物的天然资源尚未遭到严重破坏时, 在种群发生或栖息的地方对遗传资源进行保护, 运用群体生态学规律提高人工捕捞各环节的科学性和合理性; 丰富的遗传多样性意味着较强的生长和抗病等能力, 在人工繁殖过程中, 避免近亲繁殖或小群体繁殖, 注意育种的科学性和合理性, 防止经定向选择或人为基因改变后的群体混入自然群体。

### 参考文献:

[1] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7 213 -

7 218.

- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6 531 - 6 535.
- [3] 刘旭东, 相建海. 新的遗传标记技术—RAPD 及其在遗传分析中的应用[J]. *海洋科学*, 1996(4): 45 - 47.
- [4] 鲍晓明, 黄百集, 李松涛, 等. 用 RAPD 技术鉴定两个小冰麦易位系[J]. *遗传学报*, 1993, 20(1): 81 - 87.
- [5] Bardaki F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification[J]. *Heredity*, 1994, 73: 117 - 123.
- [6] 何舜平, 汪亚平, 陈宜瑜. 五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论稀有物种的系统位置[J]. *水生生物学报*, 1997, 21(3): 262 - 267.
- [7] 中国科学院动物研究所, 中国科学院海洋研究所, 上海水产学院. 南海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1962: 469 - 470.
- [8] 陆忠康. 笛鲷科鱼类养殖的现状及发展前景[J]. *现代渔业信息*, 1994, 9(4): 12 - 14.
- [9] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478 - 484.
- [10] Wachira F N, Waugh R, Backett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. *Genome*, 1995, 38: 201 - 210.
- [11] 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究[J]. *海洋与湖泊*, 2000, 31(1): 1 - 7.
- [12] Bielawski J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass[J]. *Heredity*, 1997, 78: 32 - 40.
- [13] 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扩增多态性 DNA (RAPD) 分析[J]. *海洋学报*, 2000, 22(5): 82 - 87.
- [14] 叶富良, 陈刚. 19 种淡水鱼类的生活史类型研究[J]. *湛江海洋大学学报*, 1998, 18(3): 11 - 17.

## RAPD analysis on genetic diversity of *Lutjanus johni*

YI Le-fei, LIU Chu-wu, LU Li-qiang

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** RAPD technique was used to investigate the genetic variation of natural population in *Lutjanus johni* (10 individuals) captured from Zhanjiang Port. Out of 120 decamer primers applied, only 16 primers gave stable results that 215 loci are obtained totally by the 16 primers. Out of the 215 loci, the percentage of polymorphic loci ( $P$ ) is about 78.60%. The genetic distance ( $D$ ) between the individuals is 0.273 0 on average. The genetic diversity index ( $H$ ) is 0.208 5. The results show that the nuclear genetic variability is rich comparatively and the fishing activities have not caused obvious reduction in genetic diversity of *L. johni*.

**Key words:** *Lutjanus johni*; natural population; RAPD; genetic diversity

**Corresponding author:** Liu chu-wu. E-mail: swyjs@zjou.edu.cn