

网箱养殖大黄鱼遗传多样性的 同工酶和 RAPD 分析

李星云, 张海琪, 薛良义, 竺俊全, 钟爱华

(宁波大学 生命学院, 海洋与水产业系, 浙江 宁波 315211)

摘要:采用垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳方法(PAGE)和 RAPD 技术对象山港网箱养殖大黄鱼群体遗传多样性进行检测。结果表明,所分析的 12 种同工酶共记录了 27 个基因座位,其中 3 个基因座位 *Est-2*、*Est-3* 和 *m-Adh-2* 为多态,其多态座位比例为 11.111%,平均杂合度为 0.027 9。16 个 RAPD 随机引物共检测出 119 个位点,其中多态位点 20 个(16.81%),个体间的遗传相似系数为 0.844~0.972,遗传变异度为 0.092 7,Shannon 多样性指数为 6.326,多样性值为 0.053 2。不论是同工酶电泳分析结果还是 RAPD 分析结果,均表明象山港网箱养殖大黄鱼遗传多样性水平较低。

关键词:大黄鱼;遗传多样性;同工酶;随机扩增多态 DNA

中图分类号:Q953;S965

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)06-0523-03

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)曾是我国重要的四大捕捞对象和重要经济鱼类^[1],其网箱养殖已在浙江省重要的养殖海域——象山港形成了一定的规模。目前大黄鱼的许多养殖性状出现了衰退的现象,如病害频发、生长缓慢、性成熟提早、亲鱼个体小型化、品质下降等,亟需进行遗传改良。但至今尚未对象山港大黄鱼的遗传变异进行分析。

王军等^[2-3]报道了官井洋大黄鱼同工酶研究和遗传多样性的 RAPD 分析。本研究把同工酶技术和 RAPD 技术结合起来对象山港网箱养殖大黄鱼的遗传多样性进行检测,以期揭示象山港养殖大黄鱼的遗传多样性现状,从而为大黄鱼经济性状退化原因、人工放流和种质资源的科学管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大黄鱼活鱼于 2001 年 3 月至 9 月采自宁波象山港,为浙江象山海湾育苗场培育的野生大黄鱼子二代,共 62 尾,平均全长为 24.3 cm,平均体重为 167.8 g。活体经塑料袋充氧

运回实验室,暂养以备实验用。

1.2 方法

同工酶实验采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,操作方法参考周宗汉等^[4]的方法,稍作改进。采用星普组织微量 DNA 提取试剂盒进行大黄鱼基因组 DNA 的提取,RAPD 方法参见李星云等^[5]的方法。

1.3 数据的分析

同工酶的数据分析参考相建海^[6]的方法;RAPD 数据分析方法参考 Wachira 等和王军等^[7]的方法^[2-3]。

2 结果与分析

2.1 同工酶的电泳结果

实验对同工酶 LDH、MDH、MEP、SOD、EST、ADH、FDH、GAD、ODH、GCDH、SUDH 进行了分析,由于酯酶靠近正极的酶带不清晰,故仅对前 4 个位点进行统计。12 种同工酶共记录了 27 个基因座位。其中 3 个基因座位 *Est-2*、*Est-3*(图 1)和 *m-Adh-2*(图 2)为多态,多态座位比例为 11.111%(表 1)。位点平均有效等位基因数为 1.148,群体的平均杂合度为 0.027 9。对 3 个多态位点杂合度的观察值、预期值和杂合子缺失指数进行计算可知,偏离指数较大的是 *Est-2*(-0.182 9),说明存在杂合子缺失现象。多态座位的等位基因经 χ^2 检验,皆与 Hardy-Weinberg 平衡相吻合。

收稿日期:2002-06-13; 修订日期:2003-10-20。

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划项目(2002AA603021);浙江省自然科学基金项目(399428)。

作者简介:李星云(1942-),男,教授,从事水产经济动物增殖研究。E-mail: Limingyun@nbip.net.cn

表1 象山港网箱养殖大黄鱼同工酶等位基因频率

Table 1 Allelic frequency of *P. crocea* netcage-cultured in Xiangshan Bay

基因座位 Locus	等位基因 Allele	频率 Frequency	基因座位 Locus	等位基因 Allele	频率 Frequency	基因座位 Locus	等位基因 Allele	频率 Frequency
<i>Ldh-A</i>	100	1.0000	<i>Est-2</i>	97	0.0714	<i>Fdh-1</i>	100	1.0000
<i>Ldh-B</i>	100	1.0000		100	0.8333	<i>Fdh-2</i>	100	1.0000
<i>s-Mdh-1</i>	100	1.0000		105	0.0953	<i>Gad-1</i>	100	1.0000
<i>s-Mdh-2</i>	100	1.0000	<i>Est-3</i>	95	0.2262	<i>Gad-2</i>	100	1.0000
<i>m-Mdh</i>	100	1.0000		100	0.7738	<i>Gdh</i>	100	1.0000
<i>Mep</i>	100	1.0000	<i>Est-4</i>	100	1.0000	<i>Odh-1</i>	100	1.0000
<i>m-Sod</i>	100	1.0000	<i>m-Adh-1</i>	100	1.0000	<i>Odh-2</i>	100	1.0000
<i>s-Sod-1</i>	100	1.0000	<i>m-Adh-2</i>	85	0.0595	<i>Gedh-1</i>	100	1.0000
<i>s-Sod-2</i>	100	1.0000		100	0.9405	<i>Gedh-2</i>	100	1.0000
<i>Est-1</i>	100	1.0000	<i>s-Adh</i>	100	1.0000	<i>Gedh-3</i>	100	1.0000
						<i>Sudh</i>	100	1.0000

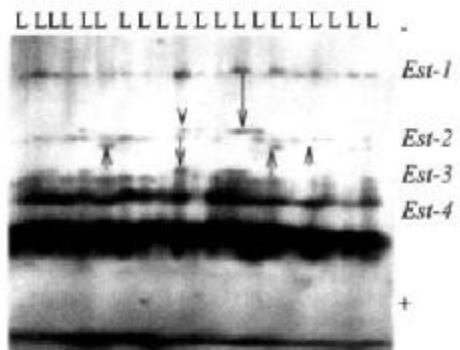


图1 大黄鱼肝 EST 同工酶的电泳图谱(箭头示多态位点)
Fig. 1 Electrophoregram of EST isozymes in *P. crocea*
(Arrows show polymorphic)



图2 大黄鱼肝 ADH 同工酶的电泳图谱(箭头示多态位点)
Fig. 2 Electrophoregram of ADH isozymes in *P. crocea*
(Arrows show polymorphic)

2.2 RAPD 结果

对40个随机引物($S_1 \sim S_{20}$ 和 $S_{101} \sim S_{120}$)的筛选表明,除了 S_9 、 S_{14} 、 S_{110} 、 S_{111} 和 S_{114} 无扩增带外,其余35个(占87.5%)引物都能产生扩增带。经筛选,16个引物(S_4 、 S_{10} 、 S_{15} 、 S_{16} 、 S_{17} 、 S_{101} 、 S_{104} 、 S_{105} 、 S_{106} 、 S_{107} 、 S_{113} 、 S_{115} 、 S_{116} 、 S_{117} 、 S_{118} 和 S_{119})用于RAPD分析,共检测出119个位点,平均每个引物

扩增出7.44个DNA片段,说明检测的位点还是比较多的。在所检测的119个位点中,具有多态现象的位点为20个,图3为其中一个($S_{10}-3$)多态位点图示,多态位点比例为16.81%。各位点的基因频率列于表2。群体个体间的遗传相似系数为0.844~0.972,平均为0.9073,遗传变异度为0.0927。群体的Shannon多样性指数为6.326,Shannon多样性值为0.0532。

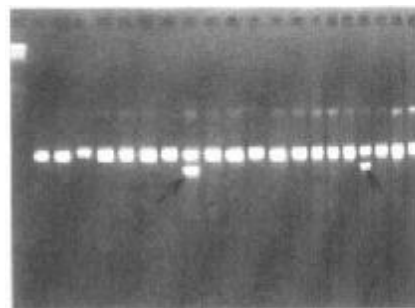


图3 大黄鱼 RAPD 图谱(引物 S_{10} , 箭头示多态位点)
Fig. 3 Electrophoresis pattern of RAPD in *P. crocea* using primer S_{10} (Arrows show polymorphic)

表2 大黄鱼 RAPD 多态位点频率

Table 2 Frequencies of RAPD polymorphic loci of *P. crocea*

位点 Locus	频率 Frequency	位点 Locus	频率 Frequency
$S_{10}-3$	0.10	$S_{105}-4$	0.15
$S_{15}-1$	0.20	$S_{107}-2$	0.45
$S_{17}-3$	0.55	$S_{113}-2$	0.50
$S_{17}-8$	0.45	$S_{113}-7$	0.40
$S_{101}-1$	0.60	$S_{113}-9$	0.30
$S_{101}-2$	0.15	$S_{115}-4$	0.30
$S_{101}-4$	0.55	$S_{117}-5$	0.60
$S_{104}-1$	0.05	$S_{117}-6$	0.65
$S_{104}-5$	0.25	$S_{118}-1$	0.15
$S_{104}-9$	0.45	$S_{119}-6$	0.45

3 讨论

采用同工酶技术检测到象山港养殖大黄鱼群体的多态位点比例为 11.111%, 平均杂合度为 0.027 9; 而运用 RAPD 技术检测到象山港网箱养殖大黄鱼的多态位点比例分别为 16.81%; Shannon 遗传多样性值为 0.053 2; 群体内个体间遗传变异度为 0.092 7。这说明了 RAPD 分析所能检测到的遗传变异比同工酶结果要大。

在同科鱼类中, 福建官井洋野生和养殖大黄鱼 RAPD 分析得出多态位点比例分别为 18.9% 和 16.7%, 个体间遗传变异分别为 0.096 和 0.074 7^[3]。中国野生和养殖鳃状黄姑鱼同工酶的多态位点比例分别为 9.09% 和 4.54%, 平均杂合度分别为 0.011 1 和 0.002 9; 养殖群体的 RAPD 分析得出多态位点比例为 15.32%, 个体间遗传变异度为 0.032^[8-9]。日本 *Nibea mitsukurii* 的同工酶多态位点比例为 34.8% ~ 39.1%, 平均杂合度为 0.059 ~ 0.094; *N. albiflora* 的同工酶多态位点比例为 30.4% ~ 34.8%, 平均杂合度为 0.029 ~ 0.054; *Pennahia argentata* 的同工酶多态位点比例为 26.1% ~ 56.5%, 平均杂合度为 0.041 ~ 0.051^[10]。与它们相比, 本研究分析的象山港养殖大黄鱼的遗传多样性水平明显低于日本海域的几种鱼类, 也低于官井洋野生大黄鱼, 稍高于官井洋养殖大黄鱼和黄姑鱼。象山港养殖大黄鱼的遗传多样性高于官井洋养殖大黄鱼, 这主要是由于在开展象山港大黄鱼的人工育苗过程中对亲本进行了选优, 避免使用个体过小的亲鱼。由此可见, 实施科学的繁育和养殖管理措施是十

分必要的。

参考文献:

- [1] 陈卫忠. 东海区主要经济鱼类资源近况[J]. 海洋渔业, 1994, 16(4): 163-167.
- [2] 王 军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 39-41.
- [3] 王 军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2001, 23(3): 87-91.
- [4] 周宗汉, 林金榜, 朱婉华. 介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J]. 淡水渔业, 1983(2): 35-40.
- [5] 李明云, 张海琪. 大黄鱼基因组 DNA 的提取及其 RAPD 分析条件的摸索[J]. 科技通报, 2002(6): 355-360.
- [6] 相建海. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 1999, 94-95.
- [7] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38: 201-210.
- [8] 丁少雄, 王 军, 全成干, 等. 鳃状黄姑鱼养殖群体遗传多样性[J]. 科学通报, 2001, 43(21): 229 4-229 9.
- [9] 丁少雄, 王 军, 全成干, 等. 野生与养殖鳃状黄姑鱼群体遗传多样性的同工酶比较[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 922-926.
- [10] Menezes M R, Taniguchi N, Seki S. Degree of intraspecific genetic divergence and variability in three Sciaenid species [J]. Jap J Ichthyol, 1990, 37(1): 39-48.

Analysis of genetic diversity of *Pseudosciaena crocea* by isozyme and RAPD

LI Ming-yun, ZHANG Hai-qi, XUE Liang-yi, ZHU Jun-quan, ZHONG Ai-hua
(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Polyacrylamide gel electrophoresis and RAPD were used to detect the genetic diversity of net cultured *Pseudosciaena crocea* in Xiangshan Bay, east China sea. The results showed that the 12 isozymes were coded by 27 gene loci, three of which were polymorphic (*Est-2*, *Est-3* and *m-Adh-2*). Mean proportion of polymorphic loci was 11.111% and the average heterozygosity was 0.027 9. Using 16 decamer random primers, 119 RAPD sites were detected, of which 20 were polymorphic (16.81%). The genetic similarity index was 0.844 ~ 0.972, and the mean genetic variation index was 0.092 7. The Shannon Weveis index was 6.326, and Shannon Weveis value of phenotypic diversity was 0.053 2. All these results indicated that the net cultured population in Xiangshan Bay had low genetic diversity.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; genetic diversity; isozyme; RAPD