

文章编号:1005-8737(2000)04-0006-04

牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异

邹曙明, 李思发, 蔡完其

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 上海 200090)

摘要:用16个10碱基随机引物对养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)进行基因组随机扩增多态性DNA(RAPD)遗传分析。发现:(1)多个引物具有种的特异性扩增带。其中引物 S_7 扩增的690和1160 bp带,引物 S_2 扩增的680 bp带为牙鲆的种的特异性谱带;而引物 S_7 扩增的653和889 bp带,引物 S_2 扩增的650、870、990及1161 bp带为大菱鲆的种的特异性谱带;(2)牙鲆和大菱鲆群体内个体间的平均遗传相似度分别为0.905和0.945;用SAS软件对群体内个体间的平均遗传相似度的方差分析结果表明,在牙鲆群体内存在显著差异($P < 0.05$),而在大菱鲆群体内则差异不显著,表明大菱鲆的种质较单一,存在近交衰退的危险;(3)牙鲆和大菱鲆的香农氏遗传多样性指数分别为2.735和3.758。

关键词:牙鲆;大菱鲆;RAPD标记;遗传变异

中图分类号:Q31;Q959.486

文献标识码:A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)同属鲽形目^[1],作为优良的底栖性鱼类,在海水养殖中占有重要地位。我国从80年代开始牙鲆的人工育苗和商品养殖,目前已达到一定的规模^[2]。大菱鲆系栖息于大西洋东北部沿岸的特有种^[3],它具有适应低水温生活,生长迅速,性格温驯,肉味细润等优点;尤其鳍边和皮下含有丰富的胶质,口感独特,酷似甲鱼裙边。在90年代我国先后多次从欧洲引进该鱼,并于1999年获得人工育苗的突破,开展了大菱鲆的养殖^[1]。目前国内尚无牙鲆和大菱鲆RAPD研究方面的报道。本研究用随机扩增多态性DNA(RAPD)技术^[4],进行牙鲆和大菱鲆基因组的遗传分析,旨在探讨它们在分子水平上遗传变异的特点和种的分子标记,为今后遗传选育、种质鉴定及种质资源的保护提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1999年10~12月,牙鲆样本8尾,取自山东省威海华信海珍品有限公司,平均体重约600 g;大菱鲆18尾,取自山东省蓬莱鱼类养殖实验场,平均体重约400 g,属该场1998年从英国引进鱼的人工繁殖第1代。随机引物为经挑选的在该2种鱼基因组中能够稳定扩增的10碱基引物,共16个,均为上海生工公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 剪取约0.3 g尾鳍,加400 μ l set缓冲液(30 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl)。混匀后加入终浓度分别为1%的SDS和200 μ g/ml的蛋白酶K,40℃作用2~5 h。加入等体积饱和酚于自制的转轮上缓慢转动1 h,10 000 r/min离心8 min,吸取上清液加入等体积混合液(酚:氯仿:异戊醇=24:24:1),缓慢转动0.5 h,弃下液层后,加等体积氯仿,缓慢转动5 min,吸弃下液层后,加等体积异丙醇或2倍体积的无水乙醇沉淀DNA,再用70%的乙醇洗

收稿日期:2000-04-20

作者简介:邹曙明(1972-),男,江西宜黄人,上海水产大学助研,硕士,从事种质资源与遗传育种研究。

1) 山东省省级大菱鲆良种场验收材料,1999。

液,干燥,加 500 μl 的 TE 溶解备用。

1.2.2 基因组 DNA 的 RAPD 分析 PCR 反应混合物中含 10 mmol/L Tris·HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 3.0 mmol/L MgCl_2 , 0.001% 的明胶, 0.1 mmol/L 各种 dNTP, 引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 约 125 ng 基因组 DNA, 2 单位 Taq 酶(Biostar 产品), 反应总体积为 25 μl , 加入 30 μl 石蜡油。于 PE480 扩增仪上反应, 循环程序为: 先 94℃ 变性 5 min, 接着 94℃ 45 s, 36℃ 45 s, 72℃ 90 s。45 个循环后, 72℃ 延伸 5 min。取 10 μl 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后照相。

1.3 数据分析

任意 2 个体间的遗传相似度和遗传距离根据 Lynch^[5]的公式计算: 经电泳获得 RAPD 图谱, 在同一电泳迁移位置上, 有 DNA 扩增条带的计为 1, 没有的计为 0。按公式 $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 计算 2 个体间遗传相似度; $P = 1 - F$ 计算 2 个体间的遗传距离。其中: N_{xy} 为个体 X 和 Y 共同拥有的带数; N_x 和 N_y 分别为个体 X 和 Y 所具有的总带数。

用 SAS 软件对群体内的所有个体间的遗传相似度进行方差分析, 比较群体内的遗传变异程度。

群体内个体间的平均遗传相似度和遗传距离通过对群体内个体间的 F 和 P 值简单平均而求得。

香农氏遗传多样性指数^[6]: $H_0 = -\sum \pi_i \ln \pi_i$

香农氏遗传多样性指数平均值^[6]: $H_0/\text{多态 DNA 扩增带}$ 。

式中: π_i 为某一条带在某一群体中出现的频率。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

本研究先用 20 个 10 碱基随机引物对牙鲆和大菱鲆样品基因组 DNA 进行扫描, 其中有 4 个引物无扩增产物或因效果不稳定不作进一步分析。其余 16 个随机引物在牙鲆和大菱鲆(共 26 尾)中均表现为扩增结果稳定, 重复性佳。在牙鲆和大菱鲆群体内各有 10 个引物的扩增结果产生多态现象, 多态引物比例均为 62.5% (10/16), 表 1 为 10 个多态引物的序列及 RAPD-PCR 的扩增结果。

DNA 扩增带大小分布在 0.20~2.50 kb 之间。16 个引物在牙鲆和大菱鲆群体内共扩增出的条带数分别为 104 和 99 条(平均每个引物扩增条带数分别为 6.5 和 6.2 条), 其中, 呈现多态现象的 DNA 带分别为 16 和 10 条, 如果以每条 DNA 扩增带作一座位计, 则多态座位占总座位比例分别为 15.4% 和 10.1%。

表 1 10 个多态随机引物扩增结果

Table 1 The amplified results of 10 random primers

引物序号 Primer No.	5'~3' 序列 5'~3' sequence	牙鲆基因组 DNA 扩增带数 Amplified band numbers of <i>P. olivaceus</i>	大菱鲆基因组 DNA 扩增带数 Amplified band numbers of <i>S. maximus</i>
S ₁	GTTTCGCTCC	5~9	6~8
S ₂	TGATCCCTGG	3~4	3~4
S ₄	GGA CTGGAGT	4~10	6~10
S ₇	GGTGACGCAG	6~8	3~5
S ₈	GTCCACACGG	9~10	9~11
S ₁₀	CTGCTGGGAC	5~8	6~7
S ₁₂	CCTTGACGCA	6~9	7~8
S ₁₄	TCCGCTCTGG	3~5	5
S ₁₅	GGAGGTGTT	5~7	4~6
S ₁₇	AGGAACGAG	7	6~9
S ₂₀	GGACCTTAC	7~9	7~9

2.2 RAPD 分子标记

引物 S₂ 和 S₇ 扩增的结果在牙鲆和大菱鲆中显示种的特异性。其中引物 S₇ 扩增的 690 和 1 160 bp 带, 引物 S₂ 扩增的 680 bp 带为牙鲆的种的特异性谱带; 而引物 S₇ 扩增的 653 和 889 bp 带, 引物 S₂ 扩增的 650、870、990 及 1 161 bp 带为大菱鲆的种的特异

性谱带(图 1)。

2.3 牙鲆、大菱鲆群体遗传多样性分析

对牙鲆 8×7 矩阵的遗传相似度分析表明, 2 个体间的遗传相似度最大为 1.000, 最小为 0.810, 平均为 0.905; 群体内的遗传距离平均为 0.095; 遗传相似度的方差分析结果表明, 在牙鲆群体内存在个

体间显著差异($P < 0.05$)。对大菱鲆 18×17 矩阵的遗传相似度分析表明,2 个体间的遗传相似度最大为 1.000, 最小为 0.920, 平均为 0.945; 群体内的遗传距离平均为 0.045; 其群体内个体间的差异不显著。

为了增加与不同实验室之间研究结果的可比

性,进一步计算了牙鲆和大菱鲆群体的香农氏遗传多样性指数。牙鲆和大菱鲆的香农氏遗传多样性指数(H_0)分别为 2.735 和 3.758; 香农氏遗传多样性指数的平均值分别为 0.170 5(多态扩增带为 16)和 0.375 8(多态扩增带为 10)。

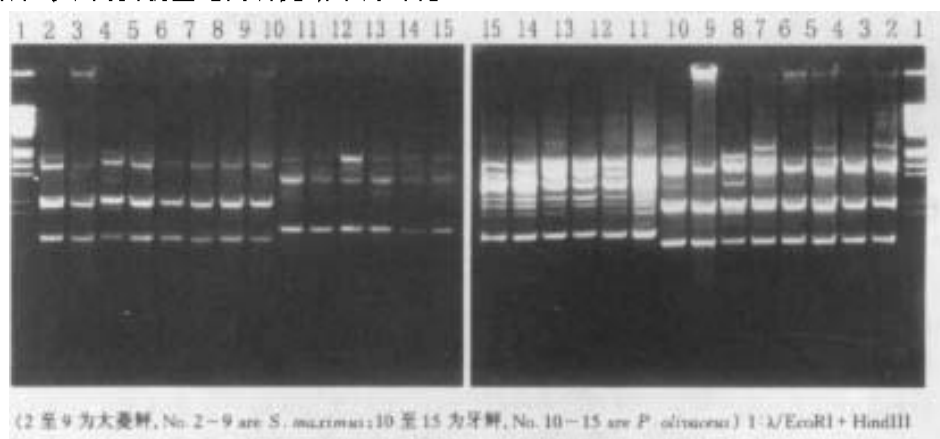


图 1 引物 S_2 和 S_7 扩增的结果

Fig.1 The amplified results of primers S_2 and S_7

3 讨论

3.1 牙鲆的遗传多样性和种质资源保护

尤锋等^[7]用同工酶研究了山东青岛和荣成近海野生牙鲆,多态比例为 31.03%。而上海水产大学水产苗种检测中心^[2]用同工酶研究了山东威海牙鲆养殖群体,多态比例为 23.08%。本文利用 RAPD 方法,获得牙鲆养殖群体平均遗传相似度为 0.905,遗传距离平均为 0.095,香农氏遗传多样性指数为 2.735,获得了多个牙鲆的种的遗传标记,可为牙鲆种质资源的深入研究打下基础。

牙鲆是我国黄、渤海沿海的重要经济鱼类^[8]。近年来的过度捕捞已使其资源严重衰减,在某些海域已近灭绝。为了缓解野生群体不足的矛盾,有些养殖场从韩国引进繁殖亲本^[9],不但带进了病害,而且造成我国沿海牙鲆种质资源的进一步混杂。另外,许多养殖场都面临着有效群体数量较少,逆向选择,近亲交配以及由此而引起的经济性状衰退,病害日趋严重^[2,10]等问题;而这些养殖后代如果进入天然海域,又可能给原本数量不大的野生群体造成严

重的后果。因此,系统地开展我国沿海牙鲆的种质研究和资源保护已迫在眉睫。

3.2 关于耐低温海水鱼类 DNA 提取方法

进行 RAPD 分析方法的关键之一是 DNA 提取质量的好坏直接影响后续的 PCR 扩增。在进行 2 种鲆的基因组 DNA 提取时,本研究曾采用常规提取条件,即消化液 55°C 作用过夜^[11,12],但未能提取到基因组 DNA。经过改进,采用约 40°C ,消化液作用 2~5 h,获得了高质量的基因组 DNA。这可能是由于这 2 种鲆同属冷水性海水鱼类,鱼肌肉蛋白具热敏性。因此,消化温度要比常规(一般 55°C)低些,消化作用时间也要短于常规(一般过夜)。

3.3 关于引进养殖鱼类生物多样性大小的维持

鱼类遗传多样性保护的一个重要内容是要知道繁殖群体遗传变异大小,从而制定出相应措施,防止人工繁殖过程中遗传背景相似品系的交配,造成遗传多样性的丧失。尤其在引进养殖鱼类,奠基群体通常都很小,种质资源很容易遭到破坏。目前,国外对大菱鲆的种质研究开展比较深入^[13~16];而在我国,大菱鲆属新引进的鱼类,尚未开展其种质研究。本研究表明,大菱鲆群体内个体间的平均遗传相似度为 0.945。且方差分析结果显示,其群体内个体

2) 上海水产大学水产苗种检测中心,山东省威海市华信海珍品有限公司牙鲆种质检测报告,1999。

间遗传差异不显著。这充分说明该场所引进的大菱鲆群体的遗传变异较小。因此,对这种鱼类要重视近交衰退问题,最好在人工繁殖 2、3 个世代后,进行 1 次遗传分析,跟踪子代杂合度和等位基因频率的变化,特别是稀有等位基因的消失情况。

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,1995,950-953.
- [2] 周丽,宫庆礼,俞开康.牙鲆的疾病[J].青岛海洋大学学报,1997,27(2):213-216.
- [3] Coughlan J, McCarthy E, McGregor D. Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Animal Genetics, 1996, 27(6):441-447.
- [4] Williams J G, A R Kubelik, K J Livak, et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18:6 531-6 535.
- [5] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7:478-484.
- [6] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection on genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38:201-210.
- [7] 尤伟,王可玲,相建海,等.山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析[J].海洋与湖泊,1999,30(2):127-134.
- [8] 鲍宝龙,张臻宇,龚小玲,等.外源甲状腺素及可的松对牙鲆早期发育阶段生长、发育和变态的影响[J].上海水产大学学报,1999, 8(3): 242-245.
- [9] 曲径,江育林,沈海平,等.牙鲆鱼淋巴囊肿病初报[J].中国动物检疫,1998, 15(2):1-5.
- [10] 童裳亮,李宏,苗宏志.牙鲆、鲈鱼和真鲷的四个永久性细胞系建立[J].生物工程进展,1997, 17(3): 1-4.
- [11] 李思发,邹曙明.中国大陆沿海六水系统鳢(中华绒螯蟹、日本绒螯蟹)群体亲缘关系和鉴别研究 I. RAPD 指纹标记[J].水产学报,1999,23(4):1-6.
- [12] 邹曙明,楼允东,孙效文,等.用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和 3 个地理群体鲤的亲缘关系[J].中国水产科学,2000, 7(1):6-11.
- [13] Harald H, Svein L, Mona M, et al. A Bkm—related DNA sequence gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1994, 107B(1): 69-73.
- [14] Estoup A, Gharbi K, SanCristobal M. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1998, 55(3):715-725.
- [15] Coughlan J P, Imsland A K, Galvin P T. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study[J]. J Fish Biol, 1998, 52(5): 916-922.
- [16] Iyengar A, Piyapattanakorn S, Stone D M, et al. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover sole (*Solea solea*) using a RAPD—based technique: Characterization of microsatellite markers in Dover sole [J]. Mar Biotechnol, 2000, 2(1):49-56.

Molecular genetic markers and variations of cultured *Paralichthys olivaceus* and *Scophthalmus maximus*

ZOU Shu-ming, LI Si-fa, CAI Wan-qi

(Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture of

Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: RAPD was employed to assess the genetic variations between 2 cultured Pleuronectiformes species (*Paralichthys olivaceus* and *Scophthalmus maximus*). The results show that: (1) Two primers can amplify distinctive bands in 16 polymorphic 10-mer primers. The 690bp and 1 160bp bands amplified by S₇, and the 680bp band by S₂ are the character of *P. olivaceus* and the 653bp, 889bp bands by S₇, the 650bp, 870bp, 990bp, 1 161bp bands by S₂ are the character of *S. maximus*. (2) The average genetic similarity index and Shannon's index of phenotypic diversity within 2 species are 0.905 and 2.735 in *P. olivaceus* and 0.945 and 3.758 in *S. maximus*. The variances of average genetic similarity between individuals within each species were detected by SAS software. There was significant difference ($P < 0.05$) among the species of *P. olivaceus* and no such character among the species of *S. maximus*. (3) Shannon's index of phenotypic diversity is 2.735 in *P. olivaceus* and 3.758 in *S. maximus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Scophthalmus maximus*; RAPD marker; genetic variation