

### 3个不同地理群体黑鲷遗传变异的 RAPD 分析

杨慧荣<sup>1,2</sup>, 江世贵<sup>1</sup>, 周发林<sup>1</sup>, 龚世园<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 利用 RAPD 技术对取自胶州湾(青岛)、台湾海峡(厦门)和北部湾(海南)3个天然群体的24尾黑鲷(*Sparus macrocephalus*)进行群体内与群体间的遗传变异分析。在事先优化的反应条件下, 所使用的60个随机引物中, 有28个引物扩增出清晰稳定的片段, 共计200条, 大小在200~2500 bp, 其中多态性片段135条(多态性片段的比例为67.50%)。青岛、厦门和海南黑鲷群体内的遗传距离分别是0.106 8、0.093 9和0.120 6, 相似系数为0.893 2、0.906 1和0.879 4; 群体间的遗传距离分别是0.155 0、0.131 8和0.122 8, 其中青岛和海南黑鲷群体间的遗传距离最大, 青岛与厦门其次, 厦门与海南最小。群体内与群体间都具有较高的遗传变异。用 MEGA2.1 软件的 UPGMA 程序和 NJ 程序进行聚类分析, 厦门与海南群体首先聚在一起, 其次是青岛群体, 两者的结果相一致。

**关键词:** 黑鲷; 遗传变异; RAPD

**中图分类号:** Q959.483 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)03-0185-05

随机扩增多态 DNA (RAPD) 是建立在 PCR 技术基础上的检测 DNA 序列多态性和建立分子遗传标记的技术。Williams 等<sup>[1]</sup>首次运用随机引物扩增寻找多态 DNA 片段作为分子遗传标记。Welsh 等<sup>[2]</sup>也发现以寡核苷酸作为引物对基因组 DNA 进行扩增, 产物的图谱表现出高度的变异性。因其具有操作简单、能够快速高效地提供许多个体或基因型许多位点的 DNA 序列多态性数据等优点, 所以它在生物的遗传多样性、群体遗传学、分类学以及农牧业的遗传育种等研究中得到广泛的应用。如 Dahle 等<sup>[3]</sup>曾用 RAPD 指纹技术研究分布于孟加拉湾的金得布尔海区 (Chandpur)、科克斯巴扎尔海区 (Cow's Bazar) 和伯尔格拉海区 (Barguna) 这3个不同地理群体云鲱 (*Tenualosa ilisha*) 的遗传变异, 采用类平均聚类法 (unweighed pair-group method of analysis, UPGMA) 和邻接法 (neighbor joining, NJ) 进行聚类分析; 国内夏德全等<sup>[4]</sup>、张四明等<sup>[5]</sup>、张锡元等<sup>[6]</sup>分别用 RAPD 技术研究了大银鱼 (*Protosalanx chinensis*)、太湖新银鱼 (*Neosalanx taihuensis*)、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 和鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 不同地理群体的遗传变异。

本实验的研究对象黑鲷 (*Sparus macrocephalus*) 属于鲈形目 (Perciformes) 鲷科 (Sparidae), 是一种名贵的海产经济鱼类, 也是我国海水鱼类养殖的重要对象, 分布在北太平洋西部, 在我国的南海、东海、黄海及渤海均有分布。我国已经对黑鲷的基础生物学和人工繁殖及养殖技术进行了大量研究, 但对黑鲷进行种质资源状况的研究较少, 本研究通过 RAPD 技术对我国胶州湾、台湾海峡及北部湾这3个不同地理群体黑鲷的遗传变异及分化进行研究, 旨在为黑鲷的种质资源研究提供相关的遗传背景资料。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料

实验所用黑鲷于2002年4、5月分别取自胶州湾(青岛, 代号: qd 群体)、台湾海峡(厦门, 代号: xm 群体)及北部湾(海南, 代号: hn 群体), 各8尾, 均为天然群体, 在取样点取鱼背部肌肉冰冻运回实验室, -70℃保存。

##### 1.2 基因组 DNA 的提取

每尾取约100 mg 背部肌肉剪碎, 加入600 μL TEN9 细胞裂解缓冲液 (Tris, Cl 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH

收稿日期: 2003-05-26; 修订日期: 2003-11-19.

基金项目: 国家科技基础工作专项计划项目; 广东省科技兴海重大项目 (A200099A01); 水科院人才基金项目.

作者简介: 杨慧荣 (1977-), 女, 硕士, 从事海洋生物学研究. E-mail: huy0821@163.com

通讯作者: 江世贵 (1964-), 男, 研究员, 主要从事海洋生物技术研究. E-mail: jiangsg@21cn.com

9.0; EDTA 100 mmol · L<sup>-1</sup>; NaCl 200 mmol · L<sup>-1</sup>), 终浓度为2%的SDS和1 mg · mL<sup>-1</sup>的Protein K, 混匀后56℃消化过夜, 分别用等体积的酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比25:24:1)和氯仿抽提, 直至无蛋白质中间相, 再用2体积无水乙醇和1/10体积NaAc(3 mol · L<sup>-1</sup>, pH 5.2)沉淀, 70%乙醇洗涤后, 用无离子超纯水溶解, -20℃存放。

### 1.3 随机引物及筛选

选用美国Operon公司试剂盒KitA、KitR与KitS共60个10 bp的随机引物。首先设定多种反应条件, 根据初步的结果, 选择其中一组条件用于后续的实验。选择一部分能扩增出清晰、稳定的带型、且条带数较多的随机引物用于本实验; 无扩增产物、扩增带型模糊及结果不稳定的, 不做进一步分析。

### 1.4 RAPD-PCR反应

PCR反应在Biometra PCR仪上进行。反应总体积25 μL, 其中10 × Taq Buffer 2.5 μL, Taq Polymerase 0.2 μL(5 U · μL<sup>-1</sup>), dNTPs(2.5 mmol · L<sup>-1</sup> each)0.5 μL, Mg<sup>2+</sup>(25 mmol · L<sup>-1</sup>)2.5 μL, 引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>)2 μL, 模板DNA 25 ng, 无离子超纯水15.3 μL。扩增条件为: 94℃预变性5 min, 再进行45个循环, 每一循环包括: 94℃45 s, 36℃45 s, 72℃90 s; 最后72℃延伸10 min。每次PCR反应均设不含模板DNA的空白对照。扩增产物经1.5% TBE琼脂糖凝胶电泳分离, EB染色, 紫外灯

光下检测、拍照。

### 1.5 数据分析

根据RAPD产物的电泳带型, 进行群体内与群体间的比较分析。按公式  $S_{xy} = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$  计算个体间遗传相似性指数( $n_{xy}$ 是个体 $x$ 和 $y$ 的共有带数,  $n_x$ 和 $n_y$ 分别是个体 $x$ 和 $y$ 的扩增带数)。群体内的相似性指数( $S$ )是群体内所有的两个个体间相似指数的平均值。群体间的相似性指数( $S_{ij}$ )为群体 $i$ 中的个体和群体 $j$ 中的个体随机组合所得相似指数的平均值<sup>[7-8]</sup>。用公式  $D = 1 - S$  计算群体内及群体间的遗传距离, 再用MEGA2.1软件的UPGMA程序和NJ程序进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 RAPD扩增结果

在供筛选的60个随机引物中, 有32个引物无扩增产物或因结果不稳定不作进一步分析。其余28个随机引物扩增结果稳定、重复性佳, 共产生200条扩增带(平均每个引物产生7条带), 片段大小在200~2 500 bp, 多态性带有135条, 如果以每条DNA扩增带作一位点计, 则多态位点占总位点的比例为67.50%。除OPA-1、OPA-17、OPR-4、OPS-6、OPS-19为单态引物外, 其余均为多态引物, 多态引物的比例为82.14%。表1为筛选出的引物编号、序列和扩增结果。

表1 筛选出的引物编号、序列和扩增结果

Table 1 Codes and sequences of primers selected and amplification results

| 引物<br>Primer     | 序列(5'-3')<br>Sequence(5'-3') | 扩增座位<br>Amplified bands | 引物<br>Primer     | 序列(5'-3')<br>Sequence(5'-3') | 扩增座位<br>Amplified bands |
|------------------|------------------------------|-------------------------|------------------|------------------------------|-------------------------|
| OPA-1            | GTTTCGCTCC                   | 5                       | OPR-5            | CTCCATGGGG                   | 6-10                    |
| OPA-2            | TGATCCCTGG                   | 2-7                     | OPR-9            | TGAGCCTCAC                   | 4-5                     |
| OPA-3            | CATCCCCCTG                   | 3-5                     | OPR-12           | GTCCCGTGGT                   | 7-13                    |
| OPA-4            | GGACTGGAGT                   | 4-8                     | OPR-18           | TGGTCCGAGA                   | 3-7                     |
| OPA-8            | GTCCACACGG                   | 5-11                    | OPS-1            | CATTGAGGCC                   | 5-10                    |
| OPA-11           | GTAGACCGGT                   | 5-9                     | OPS-2            | GTCTCGGCAA                   | 6-9                     |
| OPA-12           | CCTTGACGCA                   | 4-7                     | OPS-6            | CACCTTTCCG                   | 3                       |
| OPA-13           | TTCCCCCGCT                   | 2-5                     | OPS-10           | GTGCAACGTG                   | 3-5                     |
| OPA-14           | TCCGCTCTGG                   | 3-8                     | OPS-11           | AATGCCCCAG                   | 6-8                     |
| OPA-15           | GGAGGGTGTT                   | 3-4                     | OPS-13           | GGTTGTACCC                   | 3-5                     |
| OPA-17           | AGGGAACGAG                   | 5                       | OPS-14           | CCCGCTACAC                   | 4-10                    |
| OPA-20           | GGACCCCTAC                   | 2-5                     | OPS-18           | CCTAGTCGAG                   | 6-9                     |
| OPR-1            | CCCGGCATAA                   | 5-8                     | OPS-19           | CACAGCGGGA                   | 4                       |
| OPR-4            | CCGAACACGG                   | 4                       | OPS-20           | GTGTGCGGAG                   | 5-11                    |
| 总座位数 Total bands |                              | 91                      | 总座位数 Total bands |                              | 109                     |

## 2.2 RAPD 图谱

图1-A为单态引物OPS-6的扩增图谱,图1-B为引物OPA-12的扩增图谱,可以看出该引物几乎为一单态引物,只有青岛群体的第5和第8个体、厦门群体的第1个体有1条主亮带的缺失,图1

-C反应了引物OPR-12对部分黑鲷个体扩增的RAPD带型存在着明显的差异,在个体间体现出明显的多态性。在所使用的28个引物中,还没有发现在不同群体间有差异的扩增图谱,即没有体现群体特异性的引物。

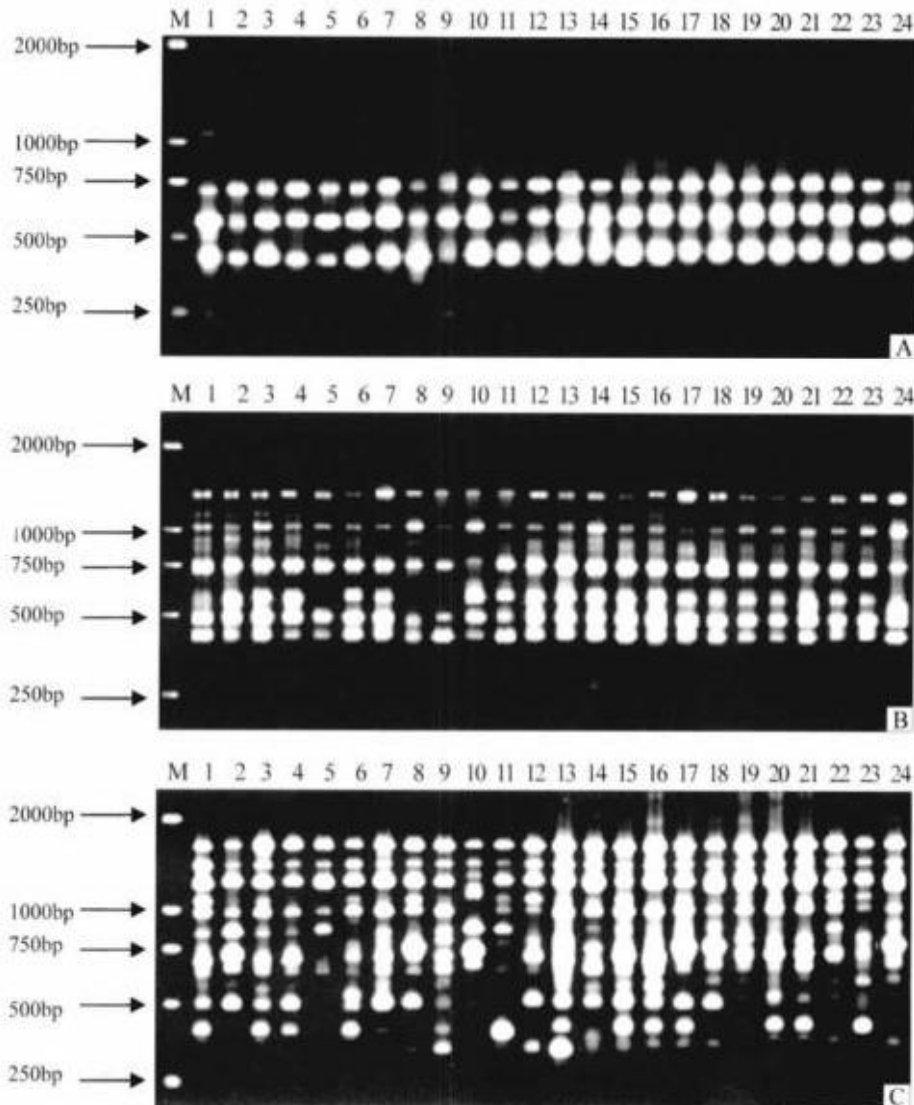


图1 引物OPS-6(A)、OPA-12(B)和OPR-12(C)对3个不同地理群体黑鲷基因组的RAPD-PCR图谱

1-8:青岛群体(qd);9-16:厦门群体(xm);17-24:海南群体(hn);M:DNA Marker(DL2000,TaKaRa公司)

Fig.1 RAPD-PCR patterns for three geographical populations of *S. macrocephalus* using primers OPA-17(A), OPA-15(B) and OPR-12(C)

1-8: Qingdao population(qd); 9-16: Xiamen population(xm); 17-24: Hainan population(hn)

## 2.3 遗传多样性与聚类分析

对3个不同地理群体黑鲷进行群体内与群体间的遗传多样性分析。表2是将电泳图谱转化成“0

-1”矩阵(详细数据略)后在RAPDDIST或RAPD-PLOT软件上换算成的遗传距离值。黑鲷3群体内相似系数是厦门群体最大,青岛群体次之,海南群体

最小,分别为0.906 1、0.893 2和0.879 4,对应群体内遗传距离值分别是0.126 5、0.106 8和0.093 9;群体间的遗传距离是青岛与海南之间的最大,青岛与厦门次之,厦门与海南最小,遗传距离值分别是0.155 0、0.131 8和0.122 8。可见群体内与群体间存在着较广泛的遗传变异,且群体间的遗传距离与

地理分布具有一致性。将表2的结果输入计算机,用MEGA2.1软件中的UPGMA程序和NJ程序进行聚类分析,得到图2和图3的谱系关系图,两种方法的结果较为一致。厦门与海南群体间的遗传距离最近,首先聚在一起,其次是青岛群体。

表2 3个不同地理群体黑鲷群体内、群体间的遗传相似系数以及群体间的遗传距离

Table 2 Inter- and intra-population genetic similarities and interpopulation genetic distances in three geographical populations of *S. macrocephalus*

| 遗传相似系数和遗传距离<br>Genetic similarities and distances | qd 群体<br>Qingdao population | xm 群体<br>Xiamen population | hn 群体<br>Hainan population |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| qd 群体<br>Qingdao population                       | 0.8932                      | 0.8682                     | 0.8450                     |
| xm 群体<br>Xiamen population                        | 0.1318                      | 0.9061                     | 0.8772                     |
| hn 群体<br>Hainan population                        | 0.1550                      | 0.1228                     | 0.8794                     |

注:对角线为群体内的相似系数,右上方为群体间的遗传相似系数,对角线左下方为群体间的遗传距离。

Notes: The numbers in diagonal of matrix indicate genetic similarities of intrapopulation. The up-right and down-left ones mean genetic similarities and distances of interpopulation, respectively.

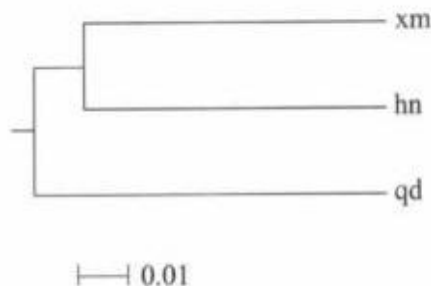


图2 用类平均聚类法构建不同群体黑鲷的谱系关系图

Fig.2 UPGMA dendrogram showing the relationships among three populations of *S. macrocephalus*

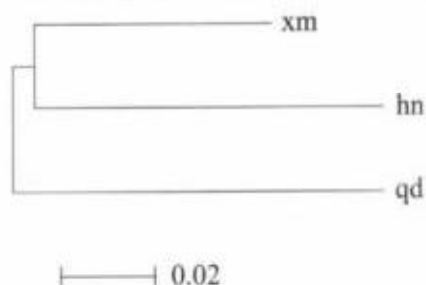


图3 用邻接法构建不同群体黑鲷的谱系关系图

Fig.3 NJ dendrogram showing the relationships among three populations of *S. macrocephalus*

### 3 讨论

本研究的3个采样区分别是胶州湾(青岛)、台湾海峡(厦门)和北部湾(海南),且均为野生群体。研究表明,青岛与海南群体间遗传差异较大,遗传距离是0.155 0;厦门与青岛群体间遗传距离是0.131 8,与海南群体间的遗传距离是0.122 8。夏德全等<sup>[4]</sup>、张四明等<sup>[5]</sup>、张锡元等<sup>[6]</sup>分别用RAPD技术研究了大银鱼(*Protosalanx chinensis*)、太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)、中华鲟(*Acipenser sinensis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)不同地理群体的遗传变异,群体间的遗传距离值位于0.035~0.190,相比之下,本研究中黑鲷不同地理群体的遗传距离值较高,相互之间的遗传差异较大。这说明3个不同海区的黑鲷应该属于相互独立的地理群体。

海南群体内的遗传距离最大,青岛群体次之,厦门群体最小,分别为0.120 6、0.106 8和0.093 9。这一结果只显示了3个地理群体在遗传多样性的差异状况。但由于实验结果中的群体间与群体内的遗传距离数值较接近,因此,这些地理群体内只有1个种群还是有2个以上种群,则还需要进一步实验、分析。群体间与群体内的遗传距离数值较接近,是否

与样品数少有直接关系,也应予考虑。

实际上不同水域的黑鲷群体其繁殖季节是有明显的区别的,青岛群体为5月初至6月初,厦门群体为3月中旬至5月初,海南群体为12月至次年3月中<sup>[9]</sup>;同时,3个地理群体所处的地理位置和气候条件也有很大差别,胶州湾属温带海洋性气候,北部湾属热带海洋性气候,厦门地处二者之间。三者在地理条件、生态环境和繁殖习性上的差异可直接造成地理隔离和生殖隔离。但是,由于现在苗种商业活动频繁,南北之间的种质交流活动越来越多,养殖过程出现物种逃逸也时有发生,因此,有必要进行跟踪研究,才能了解其种群遗传结构的变化。

#### 参考文献:

- [1] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18:6 531-6 535.
- [2] Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic [J]. Nucl Acids Res, 1991, 19:303-306.
- [3] Dahle G, Rahman M, Eriksen A G. RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) [J]. Fish Res, 1997, 32: 263-269.
- [4] 夏德全,曹 莹,吴婷婷,等.太湖中大银鱼、太湖新银鱼和嘉善新银鱼群体的遗传结构[J].水产学报,1999,23(3):254-260.
- [5] 张四明,邓 怀,汪登强,等.长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究[J].水生生物学报,2001,25(4):324-330.
- [6] 张锡元,张德春,杨代淑,等.长江鲢遗传多样性的随机扩增多态 DNA 分析[J].水产学报,1999,23(增刊):7-14.
- [7] Bardakci F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification [J]. Heredity, 1994, 73:117-123.
- [8] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7:478-484.
- [9] 江世贵,李加儿,区又君,等.四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系[J].生态学报,2000,20(3):468-473.

## Genetic diversity of three geographical populations of *Sparus macrocephalus* revealed by RAPD analysis

YANG Hui-rong<sup>1,2</sup>, JIANG Shi-gui<sup>1</sup>, ZHOU Fa-lin<sup>1</sup>, GONG Shi-yuan<sup>2</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to assess the genetic variations among inter- and intra-population of three wild stocks (24 individuals) of black porgy, *Sparus macrocephalus*, from Jiaozhou Bay (Qingdao), Taiwan Strait (Xiamen) and Beibu Bay (Hainan). Under predetermined optimal reaction conditions, the amplifications gave 200 reproducible and stable fragments ranging from 200 bp to 2 500 bp using 28 random primers selected from 60 ones. There were 135 polymorphic fragments. Based on the RAPD data, the genetic distances of intrapopulation for Jiaozhou Gulf, Taiwan Strait and Beibu Gulf were 0.106 8, 0.093 9 and 0.120 6, and the similarities were 0.893 2, 0.906 1 and 0.879 4, respectively. The genetic distances of interpopulation were 0.155 0, 0.131 8 and 0.122 8. The maximum genetic distance occurred between Jiaozhou Gulf and Beibu Gulf populations, and the minimum occurred between Taiwan Strait and Beibu Gulf populations. That showed there were high genetic diversity among inter- and intra-population. With the methods of UPGMA and NJ in MEGA2.1 on the basis of genetic distances, the results showed the populations of Taiwan Strait and Beibu Gulf assembled one branch first, then did Jiaozhou Gulf. Both results were accordant.

**Key words:** *S. macrocephalus*; genetic diversity; RAPD

**Corresponding author:** JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com