

鳊野生群体与养殖群体的 RAPD 分析

方展强, 陈军, 郑文彪, 伍育源, 肖智

(华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631)

摘要: 用 60 个随机引物对鳊 *Siniperca chuatsi* Basilewsky 野生群体和养殖群体进行随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析, 经过引物筛选, 分别用 55 个和 54 个引物对野生鳊和养殖鳊进行群体内分析。结果表明, 野生群体多态位百分率为 85.75%, 群体内遗传相似率和遗传距离分别为 0.8547 和 0.1453; 养殖群体多态位百分率为 16.39%, 遗传相似率和遗传距离分别为 0.9527 和 0.0473; 两群体间遗传相似率和遗传距离分别为 0.6905 和 0.3095; 鳊野生群体具有较高的遗传多样性, 养殖群体的遗传多样性却显著降低, 野生群体与养殖群体间有明显的遗传差异, 说明人工繁育对鳊基因组造成了显著的影响。

关键词: 鳊; 野生群体; 养殖群体; 随机扩增多态 DNA

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

鳊 *Siniperca chuatsi* Basilewsky 俗称桂花鱼, 隶属鲈形目 Perciform、鲈科 Serrinidae, 是原产于中国各主要江河湖泊的名贵食用鱼。长期以来, 由于过度捕捞、水域环境遭受破坏等的影响, 鳊的自然资源正在显著衰减, 甚至在一些地区灭绝^[1]。20 世纪 80 年代以来, 鳊养殖业在国内兴起, 但是, 人工养殖群体同野生群体的混杂已使鳊种质资源面临更严峻的威胁, 因而, 急需对鳊的遗传多样性进行评估, 为鳊的遗传改良、种质资源保护及资源合理开发利用奠定理论基础, 从而进一步推动鳊养殖业的健康发展。

随机扩增多态 DNA 技术 (RAPD) 具有灵敏、方便及多态性强等优点, 已被广泛应用于鱼类的种质鉴定, 尤其适用于近缘种及种下水平的群体遗传研究^[2]。目前, 对鳊 DNA 水平上的遗传多样性的研究尚属空缺^[3]。为了正确评估鳊养殖群体与野生群体种质标准之间存在的差异, 作者利用 RAPD 技术, 对天然水域中的原种鳊 (野生群体) 和南海良种场选育的良种鳊 (养殖群体) 进行遗传多样性分析, 从分子水平上对原种鳊的遗传多样性和人工繁育对其造成的影响进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

鳊养殖群体 (良种) 采自南海省级鳊鱼良种场, 是于 1997 年从江西鄱阳湖购进的 300 尾野生鳊经人工选育的第 5 子代, 从中随机选取 21 尾进行多态性分析; 鳊野生群体 (原种) 共 25 尾, 于 2002 年采自鄱阳湖。随机引物和生化试剂分别购自 Operon Technologies 公司和 Promega 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取 5 g 鳊的肝组织置于有液氮的不锈钢研钵中, 冷冻后快速研磨, 然后将样品溶于 50 mL 的裂解液中 (成分: 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 200 μg/mL Proteinase K, 5 g/L Sarcosyl) 搅匀, 在 50 °C 水浴中消化 3 h, 期间转动离心管数次。充分消化后加入等体积的酚抽提 3

收稿日期: 2004-03-16

基金项目: 广东省科委科技攻关项目资助 (2KB05402N)

作者简介: 方展强 (1953 -), 男, 教授。E-mail: fangzqh@scnu.edu.cn

次, 为避免抽提过程中 DNA 断裂, 每次要缓慢转动离心管 10 min, 离心分相。吸取含 DNA 的水相, 用等体积的酚/氯仿 (酚) (氯仿) (异戊醇) = 25 : 24 : 1 再抽提 2 次, 将上清液转入透析袋中, 加入 4 L 透析液 (成分: 50 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0), 10 mmol/L NaCl) 进行数次透析, 经分光光度计测定浓度 ($OD_{270} < 0.05$)。将透析袋中的液体转入离心管中, 加入无 DNA 的 RNA 酶, 使终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 3 h, 再用酚/氯仿抽提 3 次, 上清液再用 TE (成分: 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0)) 进行透析, 透析后的样品用紫外分光光度计测定浓度后待用。

1.2.2 RAPD 反应体系 参照 Williams^[4]的方法稍作改变。反应总体积为 25 μL , 其中含 10 倍稀释的 PCR 缓冲液 2.5 μL , 3.0 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 随机引物, 1.5 μL Taq DNA 聚合酶, 20 ng 模板 DNA。样品在 PE9600 扩增仪上进行扩增, 上述各成分混合后, 覆盖石蜡油 30 μL , 94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 5 min 后, 开始以下循环反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共进行 45 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 7 min, 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照, 扩增产物经质量分数为 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 在紫外光下观测并用数码相机拍照。

1.3 数据处理

统计样品电泳显示清晰稳定的 RAPD 谱带数, 个体间遗传相似率的计算公式为 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中: S 为遗传相似率; N_x 和 N_y 分别是个体 x 和个体 y 各自具有的全部谱带数; N_{xy} 则为 x 和 y 两个个体共同拥有的谱带数。个体或群体的变异度 $D = 1 - S$ 。

整个群体的遗传相似率为群体中每两个个体遗传相似率的平均值; 两个群体间的遗传相似率和变异度也按上述公式计算, 其中 x 和 y 代表两个群体中的不同个体。多态位百分率 P 为多态位点数除以位点总数, 每条谱带代表一个位点^[5]。

2 结果

2.1 引物筛选的结果

本试验选用 OPQ、OPZ、OBM 3 组共 60 个引物 (每个引物为 10 个碱基), 每个引物进行 3 次平行扩增, 除了 OPZ6、OPZ9、OPQ11、OPZ10 无任何扩增带外, 其中 OPQ19、OPZ1 仅对野生群体产生扩增带, 而 OPQ9 则对养殖群体产生扩增带, 其余的引物对野生与养殖两群体都能扩增出较清晰的带, 扩增带大小为 0.2 ~ 3.0 kb。

2.2 野生群体和养殖群体的遗传多样性分析

用 55 个引物对野生群体的 25 个个体进行 RAPD 分析, 共产生 365 个位点, 其中 313 个表现为多态, 多态位百分率为 85.75%, 群体内遗传相似率平均值为 0.8547, 遗传距离为 0.1453。用 54 个引物对养殖群体的 21 个个体进行分析, 共产生 362 个位点, 其中 59 个位点表现为多态, 多态位百分率较低, 仅为 16.39%, 群体内遗传相似率平均值和遗传距离分别为 0.9527 和 0.0473。

2.3 野生群体与养殖群体之间的遗传差异及 RAPD 分子标记

随机选取野生与养殖两群体中的个体两两进行扩增试验, 用 56 个引物共检出 251 个位点为两个群体共享, 野生群体的位点数为 365, 养殖群体的位点数为 362, 遗传相似率平均值为 0.6905, 遗传变异度为 0.3095, 可见两群体间有明显的遗传差异。

从对两群体扩增带数不同的引物中选取 8 个引物, 其产生特异性扩增位点的随机引物碱基序列见表 1。这些引物经反复试验, 重复性强, 因此, 它们的扩增图谱可以作为南海良种场选育的良种鳜 (养殖群体) 与原种鳜 (野生群体) 的种质标记 (图 1)。

表 1 8个随机引物序列及扩增结果

Tab. 1 Primer sequences used in the experiments and amplification products obtained from 8 - primers

引物	序列 (5' ~ 3')	扩增带数		引物	序列 (5' ~ 3')	扩增带数	
		良种	原种			良种	原种
OPQ1	CATTCGAGCC	3	1	OPQ20	TCTGTCGGTC	2	5
OPQ4	GTGTCGCGAG	3	1	OPM19	GTCCGTA CTG	4	1
OPQ17	GAA GCCCTTG	1	3	OPZ7	CCA GGA GGAC	5	3
OPQ18	AGGCTGGGTG	1	4	OPZ15	GGGTGGGTAA	1	5

OPM、OPQ、OPZ为随机引物； M为分子量标准； Y为野生群体； L为养殖群体

图 1 鳊野生群体与养殖群体基因组 DNA 的随机扩增产物电泳图

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPD from wild population and cultivated population of *Siniperca chuatsi*

3 讨论

3.1 鳊野生群体与养殖群体遗传多样性的比较

本研究结果表明, 鳊野生群体内的遗传相似率和遗传距离分别为 0.8547 和 0.1453, 养殖群体的遗传相似率和遗传距离分别为 0.9527 和 0.0473, 养殖群体的多态位百分率 (16.39%) 远低于野生群体 (85.75%)。究其原因, 主要在于鳊良种场所使用的野生鳊经人工选育已达第 5 子代。由于亲鱼个体间的亲缘关系非常近, 经人工繁殖获得的子代其遗传变异程度就会很低, 因而养殖群体的遗传多样性明显下降。但与其它鱼类或脊椎动物的 RAPD 结果进行比较, 如中华鲟^[6]和滇金丝猴^[7]的遗传距离分别为 0.027 和 0.052, 鳊野生群体基因组的遗传变异程度较高。

生物的遗传多样性是指物种间或种内的遗传变异程度, 是生物多样性的核心。该物种的种群遗传多样性越丰富, 其适应环境的能力就愈强, 生存和进化的潜力就越大。从遗传育种的角度而言, 遗传多样性越丰富, 其具备选育优良品种的遗传潜力就越大。本研究结果表明, 江西鄱阳湖野生鳊种群的遗传多样性较养殖群体丰富, 这意味着该野生群体蕴藏着较大的进化潜能以及较丰富的育种和遗传改良潜能^[8]。因此, 采取一定措施, 保护好野生鳊的种质资源及种质资源基因组已迫在眉睫。此外, 还应重视对野生鳊种质资源经济性状基因的定位及预测技术等方面的研究, 以期对鳊的遗传改良及种质资源的合理开发利用奠定基础。

3.2 人工繁育对原种遗传多样性的影响

用分子生物学方法分析比较了鳊原种和良种的遗传多样性及其变化, 该结果基本能反映人工繁育对鱼类基因库的影响程度。从本研究的结果看, 养殖群体的遗传多样性明显低于野生群体, 两群体间遗传相似率和遗传距离分别为 0.6905 和 0.3095, 这表明两群体间已有明显的遗传差异, 说明人工繁育对鳊基因组已造成了显著影响。许多研究表明^[9], 对鱼类的人工繁育会造成遗传多样性的降低, 其原因在于发生了 founder 效应或遗传突变, 人工繁育过程中的定向选择等也是重要原因之一。但是, 通过对南海良种场养殖群体鳊的多年观察, 发现良种鳊仍具有体宽、背高、生长快、抗病力强和肉质鲜美等特点, 并且在种质上表现出较高的一致性。这表明若能按照其特有的良种选育操作规程严格选育, 则能将其良好的种质性状保持下来, 达到选育的目标。因此, 在养殖生产中, 除了要尽力维护鱼类的遗传多样性, 还应注意保护亲鱼的有效群体, 避免近亲繁殖, 在生产各个环节中进行科学管理。权洁霞等^[8]认为, 黄河口海域梭鱼人工养殖群体的遗传多样性并没有显著降低, 而且与自然群体之间无明显的遗传分化, 其主要原因可能与粗放式人工养殖且人为干涉因素较少有关。这也是十分值得借鉴的经验。

作为广东省推广养殖的名贵食用鱼, 良种鳊在遗传上与野生鳊及其他个体户养殖的鳊有一定的差别, 而用生化遗传学技术 (如同工酶技术) 则较难检测到这种差别, 但用 RAPD 技术能产生丰富的遗传标记, 则可直接反映基因组中发生的变异。如果能进一步定位出决定经济性状的特异性 DNA 片段, 并克隆一些与经济性状有关的基因, 建立鳊的遗传连锁图谱, 这将是一项非常有意义的工作。

参考文献:

- [1] 张春光, 赵亚辉. 我国鳊资源的现状及其恢复和合理利用的途径 [J]. 生物学通报, 1999, 34(12): 9 - 11.
- [2] 邱芳, 伏建民, 金德敏, 等. 遗传多样性的分子检测 [J]. 生物多样性, 1998, 6(2): 143 - 150.
- [3] 殷文莉, 戴建华, 杨代淑, 等. 鳊和大眼鳊线粒体 DNA 比较研究 [J]. 水生生物学报, 1998, 22(3): 257 - 264.
- [4] WILLIAMS J G K, KUBEL I K A R, L VAK K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531 - 6535.
- [5] LYNCH M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478 - 484.
- [6] 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 中华鲟随机扩增多态 DNA 及遗传多样性研究 [J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(1): 1 - 7.
- [7] 兰宏, 张文验, 王文, 等. 滇金丝猴的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析 [J]. 中国科学 (C 辑), 1996, 26(3): 244 - 249.
- [8] 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 DNA (RAPD) 分析 [J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 82 - 87.
- [9] 吴力钊, 王祖熊. 长江鲢鱼天然种群的生化遗传结构及变异 [J]. 水生生物学报, 1997, 21(2): 157 - 162.

RAPD analysis of wild population and cultivated population in *Siniperca chuatsi* Basilewsky

FANG Zhan-qiang, CHEN Jun, ZHENG Wen-biao, WU Yu-yuan, XIAO Zhi

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Cultivated and wild populations of mandarin fish (*Siniperca chuatsi* Basilewsky) were analyzed using 60 random primers by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. The results indicated that the percentage of polymorphic sites, the genetic similarity rate and the genetic distance in wild population and cultivated population of the mandarin fish were 85.75% and 16.39%, 0.8547 and 0.9527, 0.1453 and 0.0473, respectively. The low genetic similarity rate (0.6905) and high genetic distance (0.3095) between two populations indicated that there was a significantly genetic differentiation, suggesting that aquaculture had led to decrease in genetic diversity.

Key words: *Siniperca chuatsi*; cultivated population; wild population; randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)