

# 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性\*

孟宪红<sup>1</sup> 孔 杰<sup>2</sup> 庄志猛<sup>2</sup> 王伟继<sup>2</sup> 刘 萍<sup>2</sup>

1( 青岛海洋大学 , 青岛 266003 )

2( 黄海水产研究所 , 青岛 266071 )

**摘 要** 采用 RAPD 技术对真鲷野生群体及人工繁殖群体各 23 个个体进行了 DNA 多态性检测。实验选取 OPK 组 16 个 10 bp 随机引物用于两群体的遗传多样性分析。在野生群体和人工繁殖群体中分别获得 131 和 123 条扩增片段 ,两群体的多态片段比例分别为 62.60% 和 54.47% ,平均杂合度分别为 0.4786 和 0.3633 ,可见真鲷野生群体及人工繁殖群体的遗传多样性较为丰富 ,在选择育种和遗传改良方面具有较大的潜力。人工繁殖群体的多态片段比例和平均杂合度都低于野生群体 ,意味着在生产过程中要采取行之有效的管理保护措施以避免或减少遗传多样性水平的降低 ,确保真鲷增殖养殖业的可持续发展。

**关键词** 真鲷 ,遗传多样性 ,RAPD

**Genetic diversity in the wild and hatchery populations of Red Seabream ( *Pagrus major* )/MENG Xian-Hong , KONG Jie , ZHUANG Zhi-Meng , WANG Wei-Ji , LIU Ping**

**Abstract** Random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) technique was employed to detect the DNA polymorphism in each 23 individuals of the index samples from the wild and hatchery populations of Red Seabream. A total of 20 decamer arbitrary primers were used and 16 of them generated clear RAPD bands. Of them , 131 were obtained from the wild population and 123 from the hatchery population. The mean percentage of polymorphic fragments of wild population was 62.60% opposite to 54.47% in the hatchery population , while the average heterozygosity valued 0.4786 and 0.3633 , respectively. The richer polymorphic bands and the higher value of average heterozygosity indicated higher genetic diversity level of this species and the great potential in piscatorial genetic improvement. The experiment revealed the fact that the percentage of polymorphic fragments and the value of average heterozygosity of the hatchery population were lower than those of the wild population. As a result , it implied that effective husbandry and management measures must be taken to avoid reduction of genetic diversity so as to enable the sustainable development of the mariculture.

**Key words** *Pagrus major* , genetic diversity , RAPD

**Author 's address** 1 ) Ocean University of Qingdao , Qingdao 266003

2 ) Yellow Sea Fisheries Research Institute , Qingdao 266071

真鲷 ( *Pagrus major* ) ,俗称红加吉 ( Red Seabream )或加吉鱼 ,是黄海、渤海、东海的主要名贵经济鱼类之一 ,20 世纪 50 年代的年渔获量在 5000 t 左右。由于人们对黄海、渤海和东海的真鲷资源进行了高强度的开发利用 ,使真鲷资源一直处于长期捕捞过度状态 ,70 年代以来已不再形成渔汛 ,资源严重衰竭 ,真鲷只能偶见于底层拖网渔获中 ( 陈大刚 ,1991 )。近年来 ,人工育苗和网箱养殖取得了较大的成功 ,真鲷在我国南北方养殖面积呈上升趋势 ,同时在黄海实施了规模较大的人工放流 ,这些人为生产实践的干预必将对物种本身和生态系统各单元产生潜移默化的影响。

鉴于真鲷在我国海水鱼类增殖业中的重要经济地位 ,查明其遗传相似度和平均杂合度 ,评估它的遗传背景 ,对真鲷的遗传改良、对海湾生物多样性的评估及保护以及增殖业的可持续发展都具有重要理论和现实意义。本文报道了采用 RAPD 技术对真鲷的野生群体及人工繁殖群体遗传多样性进行分析的结果 ,以期为评估真鲷种质资源 ,建立其遗传多样性数据库提供依据 ,同时也为在莱州湾进行真鲷放流增殖提供种质资源监测依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的真鲷野生个体于 1999 年 6 月 2 日采自黄海海州湾 ,共 23 尾 ,体长范围为 5 ~ 7 cm ;人工繁殖群体为 1989 年捕自渤海莱州湾野生群体的子二代(  $F_2$  ) ,即 :将所捕获 26 条真鲷做为亲鱼( founder stock ,  $F_0$  ) ,在黄海水产研究所麦岛实验基地进行人工繁育 ,1993 年培育出 74 条人工亲鱼(  $F_1$  )。本实验所用的样品为 1998 年 9 月 18 日采自  $F_1$  所产后代  $F_2$  ,共 23 尾 ,体长范围为 5 ~ 7 cm。所有活鱼样品运至实验室后 , - 80℃ 超低温冰柜保存备用。实验所用随机引物 OPK 系列( 1 ~ 20 ) 购自美国 Operon 公司 ,碱基序列见表 1。仪器为美国 PE 公司 PCR9600 型 ,生化试剂购自 Promega 公司。

表 1 OPK 系列 20 个引物的 DNA 序列  
Table 1 Primers used in this study and their sequences

引物 Primer	碱基序列( 5' _3' ) Sequence( 5' _3' )	引物 Primer	碱基序列( 5' _3' ) Sequence( 5' _3' )
OPK_1	CATTGAGCC	OPK_11	AATGCCCCAG
OPK_2	GTCTCCGCAA	OPK_12	TGGCCCTCAC
OPK_3	CCAGCTTAGG	OPK_13	GGTTGTACCC
OPK_4	CCGCCCAAAC	OPK_14	CCCGCTACAC
OPK_5	TCTGTCGAGG	OPK_15	CTCCTGCCAA
OPK_6	CACCTTTC	OPK_16	GAGCGTCGAA
OPK_7	AGCGAGCAAG	OPK_17	CCCAGCTGTG
OPK_8	GAACACTGGG	OPK_18	CCTAGTCGAG
OPK_9	CCCTACCGAC	OPK_19	CACAGGCGGA
OPK_10	GTGCAACGTG	OPK_20	GTGTCGCGAG

1.2 方法

基因组 DNA 的制备 :对真鲷的野生群体和人工繁殖群体样品各 23 个 ,参考《分子克隆实验指南》( 萨姆布鲁克等 ,1996 )提取 DNA。于尾部取肌肉 100 mg 左右 ,置研钵中充分研磨 ,加入 500  $\mu$ L 抽提缓冲液( 100 mmol/L Tris\_HCl ,pH 8.0 ,0.1 mol/L EDTA ,pH8.0 ) ,再加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 200  $\mu$ g/mL 的蛋白酶 K ,55℃ 水浴消化 ,每 10 min 缓摇一次 ,3 h 左右消化完全 ,溶液澄清 ,冷却后经酚  $\rightarrow$  酚 : 氯仿 = 1 : 1  $\rightarrow$  氯仿各抽提 1 遍后 ,2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA ,70% 乙醇洗涤 ,晾干后用适量双蒸水溶解 ,65℃ 灭活 10 min 后 , - 4℃ 保存备用。DNA 浓度通过紫外分光光度计和电泳 - EB 染色的荧光强度双重测定。

RAPD 反应 :条件与石拓等( 1999 )的报道基本相似。整个反应体系包括 50 mmol/L KCl , 10 mmol/L Tris\_HCl( pH9.0 ) 0.1% 的 Triton\_X100 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ; 0.1 mmol/L dNTP ; 0.2  $\mu$ mol/L 引物 , 20 ng 基因组 DNA 0.6 U *Taq* DNA 聚合酶 ,总反应体积为 25  $\mu$ l。RAPD 反应过程为 :95℃ 预变性 5 min 后进入 45 个 PCR 循环( 每个循环包括 94℃ 1 min ,36℃ 1 min ,72℃

2 min),最后 72℃ 充分延伸 10 min。RAPD 反应结束后 4℃ 保存。RAPD 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色紫外灯下观察、拍照。

1.3 数据统计分析

将 RAPD 标记作为等位基因进行多态性研究(石拓等,1999)。参照已有文献记录 DNA 条带和进行数据处理(汪小全等,1996),电泳图谱中每一条带(DNA 片段)均作为一个分子标记(marker),并代表一个引物结合位点,只记录那些电泳后条带清晰的 RAPD 标记。

多态位点比例  $P = \text{多态性扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$ ,群体的平均杂合度  $He$  参照等位酶分析的方法(Ayala & King,1984;Nei & Roychoudhury,1974;Nei,1978):

$$He = \sum_{i=1}^n (1 - X_i^2) / n$$

其中  $X_i$  是第  $i$  个等位基因出现的频率,  $n$  为基因位点个数。

2 结果

本实验所采用的 20 个随机引物中,除 OPK\_1、OPK\_5、OPK\_8、OPK\_9 外,其余 16 个引物均得到了重复性好且谱带清晰的扩增片段,其中在野生群体中获得 131 条,人工繁殖群体中 123 条,平均每个引物在两群体中分别提供 8.2 和 7.7 个标记的信息,引物 OPK\_11、OPK\_16 在养殖群体和野生群体中均表现为单态,二引物各检测出 2 个和 3 个位点。其他引物则呈现不同程度的多态 RAPD 标记。图 1 为引物 OPK\_14 分别对两个群体的扩增产物电泳结果。在

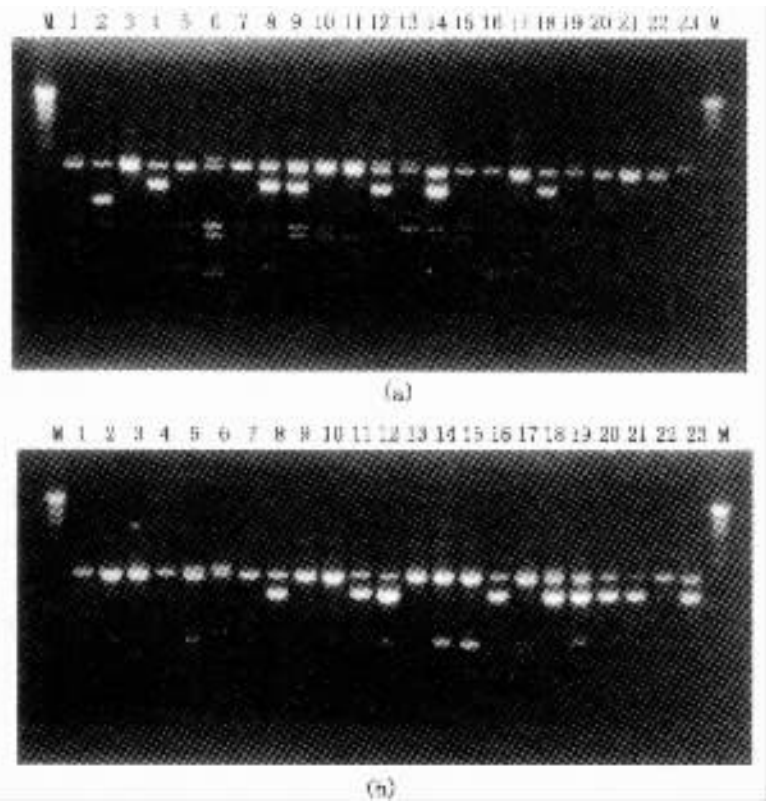


图 1 引物 OPK\_14 的 RAPD 谱带  
Fig. 1 RAPD profiles of OPK\_14 ( ZN stands for the wild population of Red Seabream )

( a )野生群体 The wild populations ( b )人工繁殖群体 The hatchery populations.  
M : Marker ; No. 1 ~ 23 : Each of 23 individuals.

野生群体中揭示的多态片段为 82 条 ,多态片段比例为 62.60% ,平均杂合度为 0.4786 ,人工繁殖群体中揭示的多态片段为 67 条 ,多态片段比例为 54.47% ,平均杂合度为 0.3633(表 2)。

表 2 真鲷野生群体和人工繁殖群体 RAPD 标记分析  
Table 2 Analysis of RAPD markers in the wild population and hatchery population of Red Seabream

	扩增片段总数 No. of amplified fragments	多态片段数 No. of polymorphic fragments	多态片段比例 Percentage of polymorphic fragments	平均杂合度 Average heterozygosity
野生群体 Wild population	131	82	62.60%	0.4786
人工繁殖群体 Hatchery population	123	67	54.47%	0.3633

3 讨论

RAPD 技术是 90 年代初在 PCR 技术基础上发展起来的一项 DNA 多态性检测新技术 (Kappe et al,1995),应用于各种动植物的多态性分析,具简便、快捷、灵敏等优点,一次可检测多个位点。本文所分析的 16 个随机引物在真鲷野生群体和人工繁殖群体检测到的位点数就多达 131 和 123 条,这充分说明了 RAPD 检测方法的高度灵敏性。另外,扩增出来的条带数多寡与群体遗传纯度有一定关系(章怀云等,1998)。Kuhnlein(1990)对不同近交水平的鸡品系进行 RAPD 检测发现,近交系数越高,则不同条带数越少,这主要是因为当近交水平和遗传纯度高时,各等位基因在一定程度上被固定,因而频率上升,数目减少。而真鲷野生群体和人工繁殖群体多态位点比例高达 62.60% 和 54.47%,说明它们具有较高的遗传变异水平,要比章怀云等(1998)测定的草鱼(0.18)、兴国红鲤(0.29)、野鲤(0.26)相应的遗传变异度和丁少雄等(1998)测定的鲢状黄姑鱼(0.0316)的遗传变异度高得多,这可能与真鲷生命周期较长、野生群体年龄组成(黄渤海真鲷的年龄由 1~10 龄鱼组成)复杂有关。较长的生命周期有利于自然选择,具有多龄结构的补充群体避免了近亲繁殖和瓶颈效应(bottleneck effect)。本实验所用人工繁殖群体中的 23 个个体来自 74 条人工亲鱼( $F_1$ ),较大的亲鱼繁殖群体也是维持较高遗传变异水平的重要因素之一。此外,本研究所采用的野生群体的代表个体采自黄海海州湾,而养殖群体的代表个体为捕自渤海莱州湾野生群的后代。渔业生物学调查研究表明,渤海莱州湾和黄海海州湾的真鲷为同一群体,莱州湾为真鲷的主要产卵场,海州湾是邻近真鲷越冬场的另一产卵场(邓景耀,1988)。

尽管真鲷的人工繁殖群体的多态片段比例高达 54.47%,大大高于脊椎动物多态性范围平均值 24.7%,甚至比其区间(14.5%~33.6%)丁少雄等(1998)的上限还要高出许多,但仍然要比真鲷的野生群体的多态性(62.60%)低。这是由于人工养殖过程中影响群体遗传多样性的瓶颈效应、遗传漂变和近亲杂交等因素,使养殖群体基因库不可避免地会丧失某些特定的等位基因,因此造成养殖群体的遗传变异度及遗传多样性水平均低于野生群体的状况。这在许多人工养殖动物的检测中均已得到证实(李思发,1988;Kirsten & Jenny 1993;Welsh & Michael,1990)。因此,通过结合 RAPD 这一强有力的分子标记技术进行遗传育种,可以使鱼类育种周期缩短,并改良其生长慢、饵料系数高、抗逆性弱等不良性状,加快选育过程,同时还可避免遗传多样性降低。这种基因工程技术应用于真鲷的生产实践以及其他品种的增养殖,必将为水产养殖的可持续发展提供强有力的保证。

RAPD 的扩增产物是呈显性孟德尔式分离的( Maria & Daniel ,1996 ;Hunt et al. ,1992 ) ,由于其显性遗传标记 ,只能检测一对等位基因的有无 ,而不能够区分显性纯合体和杂合体 ,因此一般在进行数据处理时是将一个扩增产物片段作为一个遗传位来分析的。由于同工酶电泳分析在品种质量和纯度鉴定以及动植物群体遗传结构研究中占有不可忽视的地位 ,拟定再用传统的生化方法——同工酶技术对真鲷野生群体及养殖群体遗传多样性进行分析 ,将其与 RAPD 结果相结合 ,从而得到更加可靠的分析数据 ,为评估真鲷种质资源、建立遗传数据库提供详实依据。

## 参 考 文 献

- 陈大刚 ,1991. 黄渤海渔业生态学. 北京 :海洋出版社 ,302 ~ 305
- 邓景耀 ,1988. 渤海渔业资源增殖与管理的生态学基础. 海洋水产研究 ,**9** :1 ~ 10
- 丁少雄 ,王军 ,全成干 ,苏永全 ,1998. 鲢状黄姑鱼养殖群体的遗传多样性. 科学通报 ,**43**( 1 ) :2294 ~ 2298
- 李思发 ,1988. 鱼类繁育群体遗传性能的保护. 水产学报 ,**12**( 3 ) :283 ~ 290
- 萨姆布鲁克 ,费里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T( 著 ) ,金冬雁 ,黎孟枫等( 译 ) ,1996. 分子克隆实验指南( 第二版 ). 北京 :科学出版社 ,464 ~ 468
- 石拓 ,孔杰 ,刘萍 ,韩玲玲 ,庄志猛 ,邓景耀 ,1999. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋与湖沼 ,**30**( 6 ) :609 ~ 615
- 汪小全 ,邹喻苹 ,张大明 ,洪德元 ,刘正宇 ,1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学( C 辑 ) ,**26**( 5 ) :436 ~ 441
- 章怀云 ,刘荣宗 ,张学文 ,陈韬 ,肖调义 ,李晋衡 ,1998. 草鱼和鲤鱼群体遗传变异的 RAPD 指纹分析. 水生生物学报 ,**22**( 2 ) :168 ~ 173
- Ayala F J , Kinger J A Jr ,1984. Modern Genetics ( 2<sup>nd</sup> edition ). Menlo Park :The Benjamin\_Cummings Publishing Company
- Hunt G J , Robert E , Page Jr ,1992. Pattern of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honeybee. *Theoretical Applied Genetics* ,**85** :15 ~ 20
- Kappe A L , Zande L V D , Vedder E Z , Bijlsma R , van Delden W ,1995. Genetic variation in *Phoca vitulina* revealed by DNA fingerprinting and RAPDs. *Heredity* ,**74** :647 ~ 653
- Kirsten W , Jenny P V ,1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum using random primers. *Heredity* ,**71** :335 ~ 341
- Kuhnlein U ,1990. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting : development of a calibration curve using defined strains of chickens. *Genetics* ,**125** :161 ~ 165
- Maria E D , Daniel C ,1996. Genetic diversity of populations of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii* evaluated by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology* ,**16**( 4 ) :578 ~ 588
- Nei M ,1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Journal of Human Genetics* ,**23**( 4 ) :341 ~ 369
- Nei M , Roychoudhury A K ,1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* ,**76**( 2 ) :379 ~ 390
- Welsh J , Michael M ,1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* ,**18**( 24 ) :7213 ~ 7218

( 责任编辑 :时意专 )