

文章编号:1001-5132 (2007) 02-0174-05

日本黄姑鱼与鲩状黄姑鱼的分子标记和遗传变异

柴学军, 胡则辉, 徐君卓

(浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100)

摘要: 利用 RAPD 技术对日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)和鲩状黄姑鱼(*Nibea miichthioides*)养殖群体进行了基因组 DNA 遗传分析. 从 120 个随机引物中, 筛选出 19 个扩增效果好, 条带清晰的引物进行扩增. 结果表明: (1) 日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼群体内个体间的平均遗传相似性分别为 0.885 3 和 0.890 1; 用 SPSS 软件对群体内个体间遗传相似性的方差分析结果表明, 在鲩状黄姑鱼群体内存在显著差异($P < 0.05$), 而在日本黄姑鱼群体内则差异不显著, 表明日本黄姑鱼的种质较单一, 存在近交衰退的危险; (2) 2 种黄姑鱼之间相似性为 0.785 0, 遗传距离为 0.215 0, 由此判断 2 种黄姑鱼为同一属的 2 个不同物种, 这与形态学分析的结果相一致.

关键词: 日本黄姑鱼; 鲩状黄姑鱼; RAPD 标记; 遗传变异

中图分类号: S917

文献标识码: A

黄姑鱼属隶属鲈形目, 石首鱼科, 包括 7 个种: 浅色黄姑鱼(*Nibea coibor*)、黄姑鱼(*N. albiflora*)、半花黄姑鱼(*N. semifasciata*)、双棘黄姑鱼(*N. diacanthus*)、鲩状黄姑鱼(*N. miichthioides*)、日本黄姑鱼(*N. japonica*)和尖头黄姑鱼(*N. acuta*)^[1]. 自然分布于我国沿岸近海, 北起黄海南部, 经东海、台湾海峡, 南到雷州半岛以东. 其中, 作为重要的经济海水鱼类, 日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼的人工繁殖成功, 解决了黄姑鱼网箱养殖的苗种来源, 有效减轻了捕捞压力.

日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼形态特征非常相似, 种的表型易受到地理位置和环境的影响, 用形态学的方法有时难以准确鉴别. 因此, 从遗传本质上寻找相互间的差异有助于更清楚地鉴别它们. RAPD 技术以其检测灵敏度高, 多态性强等特点而广泛采

用, 该技术已成功应用在多种海水鱼类遗传图谱构建, 遗传多样性和种质鉴定等方面, 并获得了较好的效果^[2-7]. 目前, 从分子水平研究黄姑鱼的报道仅见于鲩状黄姑鱼^[8,9]和双棘黄姑鱼^[10]. 因此, 本文拟采用 RAPD 技术, 进行这 2 种鱼基因组 DNA 的遗传分析, 旨在探讨二者在分子遗传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 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用人工养殖的日本黄姑鱼样本 20 尾, 2006 年 4 月取自浙江平阳县南麂岛开发有限公司深水网箱, 平均体长 22.9 cm, 平均体重约 217 g.

鲢状黄姑鱼 20 尾,取自福建沙埕养殖试验场,平均体长 21.1 cm,平均体重 182 g. 分别从 2 种鱼的活体上取尾鳍,用 70%(V/V)乙醇保存^[11,12].

动物基因组提取试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、ddH₂O、琼脂糖等购自上海生工生物工程技术服务有限公司. RAPD 引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司和上海申能博采生物技术有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

参照上海生工公司的动物基因组提取 Kits,并略作修改.

1.2.2 基因组 DNA 的 RAPD 分析

RAPD-PCR 在 Gene9700 型 PCR 扩增仪上进行. 25 μL PCR 反应体系: 2.5 μL PCR 缓冲液(100 mmol·L⁻¹ KCl, 80 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.0, 2.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂), 1 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs, 1 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物, 25 ng 基因组 DNA, 1 U *Taq* DNA 聚合酶. 120 条随机引物经筛选,其中 19 条(表 1)可以成功地用于 RAPD-PCR 扩增. 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 然后按 94 °C 变性 1 min、36 °C 退火 1 min 和 72 °C 延伸 2 min 进行 45 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min.

取 10 μL PCR 扩增产物,加适量的 6×加样缓冲液(0.25% 溴酚蓝, 40%(W/V)蔗糖水溶液),在 1.4% 琼脂糖凝胶上(含 0.5 μg·mL⁻¹)按 5 V·cm⁻¹ 凝胶电压下进行电泳分析,紫外灯下观察,拍照. 电泳缓冲液 1×TAE(8 mmol·L⁻¹ Tris-乙酸, 0.2 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0).

1.3 数据分析

由 RAPD-PCR 图谱统计出共有带和特征带后,通过以下公式计算出存在于群间或类群内的多态性: $P(\text{多态性}) = (\text{总带数} - \text{共有带数}) / \text{总带数}$ ^[13].

香农氏遗传多样性指数^[14]通过公式 $H_0 = -\sum p_i \cdot \ln p_i$ (p_i 为位点 i 在群体中的出现频率)来进行计算. 香农氏遗传多样性指数平均值^[14]: $H_0 / \text{多态 DNA 扩}$

增带.

用 NTSYS-pc 软件分析数据,任意 2 个体间的遗传相似度公式为: $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ^[15], 其中 N_{xy} 为个体 X 和 Y 共有的条带数, N_x 和 N_y 分别为 2 个个体扩增的条带数, 个体间遗传距离 $D_{xy} = 1 - S_{xy}$. 群体内遗传相似度 S : 群体内所有 2 个个体间相似度的平均值, 群体内遗传距离 $D = 1 - S$.

用 SPSS 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.

表 1 19 个随机引物扩增结果

引物	引物序列	多态性条带数/总条带数	
		日本黄姑鱼	鲢状黄姑鱼
S103	AGACGTCCAC	0/5	0/4
S118	GAATCGGCCA	2/5	2/6
S129	CCAAGCTTCC	2/6	3/8
A09	GGGTAACGCC	3/10	2/9
B07	GGTGACGCAG	4/13	3/12
B08	GTCCACACGG	3/9	3/10
D20	ACCCGGTCAC	2/6	3/7
F04	GGTGATCAGG	1/4	2/4
H04	GGAAGTCGCC	1/5	1/5
H12	ACGCGCATGT	4/11	2/11
H03	AGACGTCCAC	2/9	2/9
P11	AACGCGTCGG	1/5	1/5
P16	CCAAGCTGCC	0/4	0/4
P17	TGACCCGCCT	0/5	0/5
V08	GGACGGCGTT	2/5	1/6
V10	GGACCTGCTG	1/3	1/4
Y13	GGGTCTCGGT	1/7	2/8
Y14	GGTCGATCTG	2/3	1/4
Y15	AGTCGCCCTT	1/6	3/7
合计		32/121	32/128

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

根据所提取基因组的质量和数量,选取日本黄姑鱼和鲢状黄姑鱼各 16 个样本进行 PCR 扩增. 选用 120 个 10 碱基随机引物对日本黄姑鱼和鲢状黄姑鱼的群体基因组进行 RAPD 分析,其中 19 个随

机引物在 2 种黄姑鱼(总共 32 尾)中均表现为扩增结果稳定,重复性好.在日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼群体中均有 16 个引物的扩增结果产生多态现象,多态性引物的比例为 84%,表 1 为 19 个随机引物的序列及 RAPD-PCR 的扩增结果.

DNA 扩增带大小分布在 0.2~3.0 kb 之间. 19 个引物在日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼群体内共扩增出的条带数分别为 121 条和 128 条(平均每个引物扩增条带数分别为 6.4 条和 6.7 条),其中,呈现多态现象的 DNA 带均为 32 条,如果以每条 DNA 扩增带作一座位计,则多态座位占总座位的比例分别为 26.4%和 25.0%.

2.2 日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼群体遗传分析

对日本黄姑鱼 15×14 矩阵的遗传相似度分析表明:2 个个体间的遗传相似度最大为 0.953 5,最小为 0.825 6,平均为 0.885 3;群体内的遗传距离平均为 0.114 7;遗传相似度的方差分析结果表明,在日本黄姑鱼群体内个体差异不显著($P > 0.05$).对鲩状黄姑鱼 15×14 矩阵的遗传相似度分析表明:2 个个体间的遗传相似度最大为 0.945 1,最小为 0.813 2,平均 0.890 1,群体内的遗传距离为 0.109 9;遗传相似度的方差分析结果表明,在鲩状黄姑鱼群体内个体间存在显著差异($P < 0.05$).2 种黄姑鱼群体间的相似系数为 0.785 0,遗传距离为 0.215 0.

为增加与其他研究结果的可比性,进一步计算 2 种黄姑鱼的香农氏遗传多样性指数.日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼的香农氏遗传多样性指数(H_0)分别为 3.322 和 2.766;香农氏遗传多样性指数的平均值分别为 0.103 8 和 0.086 4(多态扩增带均为 32).

3 讨论

3.1 2 种黄姑鱼遗传多样性的评价

结果显示,多态引物占总引物的 84%,说明 2 群体的黄姑鱼基因组 DNA 存在一定水平的遗传变异.就多态位点而言,日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼的

多态性为点比例(26.4%和 25.0%)稍高于一般脊椎动物的平均值(24.7%),将不同种类鱼 RAPD 研究结果进行横向和同属内比较,结果见表 2.同时结合香农氏遗传多样性平均指数(0.103 8 和 0.086 4),表明日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼的遗传多样性水平较低,这与多年来人工繁育引起养殖群体的“瓶颈”效应不无关系^[16-19].

表 2 不同鱼虾的 RAPD 研究结果比较^[8,10,17-24]

种名	多态性/%	相似系数	遗传距离
鲩状黄姑鱼 (<i>N. miichthioides</i>)	15.70	0.967 0	0.033 0
双棘黄姑鱼 (<i>N. diacanthus</i>)	41.90	0.934 3	0.065 7
中华鲟 (<i>Acipenser sinensis</i> Gray)	11.10	0.974 3	0.026 7
中国对虾 (<i>Penaeus chinensis</i>)	39.00	0.907 0	0.093 0
大黄鱼 (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	16.70	0.925 3	0.074 7
牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	15.40	0.905 0	0.095 0
大菱鲆 (<i>Scophthalmus maximus</i>)	10.10	0.945 0	0.055 0
南美白对虾 (<i>Penaeus vannamei</i>)	50.91	0.862 3	0.137 7
花鲈 (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	48.48	0.881 5	0.118 5
野生牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	59.09	0.825 7	0.174 3
养殖牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	60.91	0.824 5	0.175 5
大黄鱼 A (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	33.33	0.907 9	0.092 1
大黄鱼 B (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	43.75	0.878 4	0.121 6
日本黄姑鱼 (<i>N. japonica</i>)	26.40	0.885 3	0.114 7
鲩状黄姑鱼 (<i>N. miichthioides</i>)	25.00	0.890 1	0.109 9

3.2 黄姑鱼生物多样性的维持及养殖意义

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进行交配,造成遗传多样性的丧失.由于长期以来的酷渔滥捕,使黄姑鱼的资源枯竭,20 世纪 90 年代初鲩状黄姑鱼的人工育苗获得成功,2000 年从韩国引进日本黄姑鱼,不仅掌握了全人工育苗技术,也已成为

网箱养殖开发的新种类,缓解了对黄姑鱼捕捞的压力。目前,在国内外尚未见对日本黄姑鱼的种质研究报告,仅见丁少雄等人^[8,9]研究了鲩状黄姑鱼的遗传多样性。本研究表明,日本黄姑鱼群体内个体间的平均遗传相似度为 0.885 3,且方差分析结果显示,其群体内个体间差异不显著。这说明日本黄姑鱼群体变异较小。鲩状黄姑鱼群体内个体间平均遗传相似度略高于日本黄姑鱼,但是个体间差异显著。在今后日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼养殖中,可以选择遗传变异较高的亲鱼培育种苗。在保证不伤害亲鱼生命的情况下,利用鱼鳍或者血液等样品,借助RAPD等分子遗传标记选择个体间遗传相似性较低的个体作为亲本,维持较大的亲本数量,并且定期更换或者交流亲本群体,尽量减少养殖过程中的遗传漂变、瓶颈效应、近亲杂交等因素造成的遗传变异及遗传多样性的丧失,确保资源的可持续利用。

3.3 日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼的遗传差异

本研究用 19 个随机引物进行的RAPD分析结果表明:2种黄姑鱼间相似系数为 0.785 0,遗传距离为 0.215 0。根据Theorpe^[25]遗传相似度 $S < 0.85$,遗传距离 $D > 0.15$ 的 2 个种群不可能是同一物种,同属种间的 S 为 0.2 ~ 0.8, D 为 0.2 ~ 0.8,同种种群间 S 是 0.8 ~ 0.97, D 为 0.03 ~ 0.2。据此日本黄姑鱼和鲩状黄姑鱼应为同属的不同物种,这与前人对 2 种黄姑鱼的形态区别是一致的^[1]。

参考文献:

- [1] 谢忠明,徐君卓,杨星星,等. 黄姑鱼养殖技术[M]. 北京:金盾出版社,2004.
- [2] Bielawski J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of Atlantic Coast striped bass[J]. Heredity, 1997, 78:32-40.
- [3] Bardakci F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification[J]. Heredity, 1994, 73:117-123.
- [4] Dinesh K R, Lim T M, Chua K L, et al. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes[J]. Zool Sci, 1993, 10:849-854.
- [5] Johnson S L, Midson C, Ballinger E W, et al. Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish[J]. Genomics, 1994, 19:152-156.
- [6] Kazianis S, Morizot D C, McEntire B B, et al. Genetic mapping in Xiphophorus hybrid fish: assignment of 43 AP-PCR/RAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups[J]. Genome Res, 1996, 6:280-289.
- [7] Liu Z J, Li P, Argue I B J, et al. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish [J]. Aquaculture, 1999, 174:59-68.
- [8] 丁少雄,王军,全成干,等. 鲩状黄姑鱼养殖群体的遗传多样性[J]. 科学通报, 1998, 43(21):2 294-2 299.
- [9] 丁少雄,苏永全,王军,等. 闽粤沿海鲩状黄姑鱼野生种群和人工繁育群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2003, 27(8):63-66.
- [10] 郭明兰,苏永全,丁少雄,等. 双棘黄姑鱼人工繁育群体遗传多样性的RAPD分析[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45(2):293-293.
- [11] 魏育红,薛仁宇,曹广力,等. 乙醇固定中华绒螯蟹组织的 DNA 提取方法[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4):116-118.
- [12] 张海琪,薛良义,李明云,等. 不同保存方法的大黄鱼肌肉样品基因组 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3):296-299.
- [13] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [14] Wachira F N, Waugh R, Hacker C A, et al. Detection of genetic diversity in tea(*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38:201-210.
- [15] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7:478-484.
- [16] 宋林生,相建海,李晨曦,等. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的RAPD标记研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3):261-265.
- [17] 张四明,邓怀,晏勇. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(1):1-7.
- [18] 邱高峰,常林瑞. 我国近海中国对虾种群遗传差异的 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(1):1-5.
- [19] 王军,全成干,苏永全,等. 宫井洋大黄鱼遗传多样性

- 的 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2001, 23(3):87-91.
- [20] 邹曙明, 李思发, 蔡完其. 牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4):6-9.
- [21] 张海琪, 丁雪燕, 薛辉利, 等. 南美白对虾两养殖群体遗传多样性的比较分析[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2006, 19(1):44-48.
- [22] 李卢, 薛良义, 韦家永. 花鲈养殖群体随机 DNA 多态性分析[J]. 水利渔业, 2006, 26(2):13-14.
- [23] 房新英, 张全启, 齐洁, 等. 野生和养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)遗传差异的 RAPD 和 ISSR 研究[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(2):138-142.
- [24] 丁诗华, 黄丽英, 张海琪, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)岱衢洋选育群体和官井洋养殖群体的遗传差异分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(1):41-46.
- [25] Theorpe J P. The molecular dock hypothesis: biochemical evaluation, genetic differentiation, and systematics[J]. Am Res Ecol Syst, 1982, 13:139-168.

Molecular Genetic Markers and Variation of Cultured *Nibea japonica* and *Nibea miichthioides*

CHAI Xue-jun, HU Ze-hui, XU Jun-zhuo

(Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: As important economic marine fish, *Nibea japonica* and *Nibea miichthioides* are similar in morphological characters, which are easily influenced by the geographical regions and environments. Therefore, it is often difficult to distinguish them accurately at morphological level, and then investigating the genetic differences becomes necessary. Among many identifying methods is the RAPD technique which has been widely used in species identification process. Sixteen polymorphic random primers were selected from 120 Operon's primers to amplification purposes. The results show that: (1) The average genetic similarity index within two species is 0.8853 in *N. japonica* and 0.8901 in *N. miichthioides*. The variances of average genetic similarity between individuals within each species were detected by SPSS software. There was significant difference ($P < 0.05$) among the species of *N. miichthioides* and no such character among the species of *N. japonica*. (2) The genetic distance between the two species was 0.2150, indicating the *N. japonica* and *N. miichthioides* belong to two different species, respectively.

Key words: *Nibea japonica*; *Nibea miichthioides*; RAPD marker; genetic variation

CLC number: S917

Document code: A

(责任编辑 史小丽)