

厦门近海横带髭鲷野生群体遗传结构分析

王世锋, 杜佳莹, 苏永全, 刁雄, 王 军*

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对厦门近海横带髭鲷野生群体 46 个个体进行遗传多样性分析. 在 RAPD 分析中筛选出 31 个随机引物, 共扩增产生 235 个可统计的条带, 其中多态性条带 106 个, 多态位点百分率为 45.11%, Shannon's 遗传多样性指数为 0.243 0; 在 ISSR 分析中筛选出 16 个 ISSR 引物, 共扩增产生 119 个可统计的条带, 其中多态性条带 76 个, 多态位点百分率为 63.78%, Shannon's 遗传多样性指数为 0.348 9. 与其它鱼类横向对比显示, 厦门近海横带髭鲷野生群体的遗传变异处于中上水平, 具有较高的遗传多样性.

关键词: 横带髭鲷; 遗传多样性; RAPD; ISSR

中图分类号: Q 959.4; Q 953

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)01-0088-06

横带髭鲷 *Haplochromys mucronatus* 隶属鲈形目 (Perciformes)、石鲈科 (Pomadasyidae)、髭鲷属 (*Haplochromys*), 为暖温性中下层鱼类, 喜集群, 栖息于多岩礁海区, 以底栖甲壳类、鱼类及贝类等为食, 主要分布于北太平洋西部, 我国沿海、朝鲜、日本和菲律宾海域均有分布^[1]. 横带髭鲷不仅肉质鲜美, 而且体色艳丽, 既是港澳台、日本和东南亚地区较为畅销的食用鱼类, 也是人们喜爱的海水观赏鱼类.

横带髭鲷在我国沿海自然海区均可捕获, 因其野生资源总量偏小, 渔获量不大. 迄今为止, 有关横带髭鲷的基础研究报道较少^[2-3]. 本文以厦门近海捕捞的横带髭鲷野生群体为研究对象, 采用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术评估了该群体的遗传多样性, 阐明了其遗传背景, 为横带髭鲷的资源保护与利用提供了重要的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料来源

横带髭鲷野生群体于 2003 年 6 月至 9 月间采自福建厦门海区, 共 46 尾.

1.2 引物筛选

用于分析横带髭鲷遗传多样性的 RAPD 随机引物购自上海生物工程公司生产的 S460~S480 与 S501~S520 系列; ISSR 分析所用的引物核心序列参考梁君荣^[4]以及 Genbank 中石鲈科鱼类的微卫星序列设

计, 锚定碱基按照 A、T、G、C 两两组合(除 AT 和 TA 组合), 共设计出 ISSR 引物 52 个, 由上海生工合成.

1.3 实验方法

DNA 提取: 参考 Sambrook 等的酚/氯仿抽提法^[5].

PCR 扩增和检测: 扩增反应均在 PE9700 型 PCR 仪上进行, 反应体积为 25 μ L, 其中含 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 1.5~2.0 μ L, 25 pmol/L 引物 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, DNA 模板 25 ng, *rTaq* 酶 0.6 U, 无菌重蒸水 (ddw) 补足 25 μ L. (Mg^{2+} 浓度和退火温度随引物不同而改变). 扩增程序经实验优化后采用: 94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 36 $^{\circ}$ C (RAPD)/52~58 $^{\circ}$ C (ISSR) 45 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 2 min) $\times$ 38 cys $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 7 min. RAPD 和 ISSR 的 PCR 产物分别在 1.5% 和 2.0% 的琼脂糖上电泳, 之后于 0.5 μ g/mL 的 EB 中浸泡 0.5 h, 在 GAS7001B 凝胶成像分析系统上观察和拍照.

1.4 数据分析

将 RAPD、ISSR 电泳图谱记录后进行人工读带, 同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 属于同一位点的产物, 按扩增阳性记为 1 和扩增阴性记为 0 的格式输入计算机, 构成 RAPD、ISSR 表型数据矩阵. 同一位点的扩增片段频率大于 0.95 的位点为单态位点, 频率在 0.05 到 0.95 间为多态位点, 频率小于 0.05 的位点不纳入统计. 对群体遗传参数的统计基于以下两个假设: 1) 横带髭鲷群体基本处于 Hardy-Weinberg 平衡; 2) 统计条带时认为电泳迁移率相同的条带是扩增基因组上相同 DNA 片段的产物. 采用 Popgene1.32 软件对厦门近海横带髭鲷野生群体

收稿日期: 2007-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(30070595)资助

* 通讯作者: jun.w@xmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

46 个个体间进行遗传参数分析, 分别计算其多态位点百分率(PPB, Percentage of Polymorphic Bands)、遗传相似系数(*S*, genetic similarity)、遗传距离(*D*, genetic distance) 和 Shannon's 信息指数(*I*, Shannon's information index).

2 结 果

对提取的基因组 DNA 样品进行紫外吸收测定, *A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 比值都在 1. 70~ 1. 90 之间, 说明其蛋白质和 RNA 含量很少, 为 RAPD 和 ISSR 检测提供了良好的

模板条件.

2. 1 横带髯鲷遗传多样性的 RAPD 分析

从 40 个 RAPD 随机引物(S461~ S480, S501~ S520) 中筛选出 31 个扩增重复性好、带型清晰的引物(表 1), 对横带髯鲷厦门野生群体的 46 个 DNA 的遗传多样性进行 RAPD 检测, 图 1 为引物 S480 和 S517 对该野生群体 46 个个体 DNA 样品的扩增结果. 31 个引物扩增出的条带数目 1~ 13 不等, 片段大小在 0. 25 ~ 2. 5 kb 之间(图 1). 共扩增产生了 235 个可统计的条带, 其中检测到 106 个多态位点, 多态位点百分率

表 1 用于 RAPD 扩增分析的随机引物序列及多态性
Tab. 1 Primers used and polymorphism of RAPD marker

引物	序列	统计条带数	多态性条带数	多态位点百分率/ %
S461	GTAGCACTCC	9	3	33. 3
S462	TCGGCACGCA	4	1	25
S463	CTGATACGCC	5	3	60
S465	CCCCGGTAAC	13	8	61. 5
S466	GTGGGCTGAC	5	4	80
S467	GTCCATGCCA	11	7	63. 6
S468	ACATCGCCCA	12	2	16. 7
S469	GTGGTCCGCA	7	5	71. 4
S470	TCCCGCCTAC	8	6	75
S471	AACGCGTCGG	11	8	72. 7
S474	CCAGCCGAAC	7	2	28. 6
S475	CCAAGCTGCC	7	0	0
S476	TGACCCGCCT	4	0	0
S480	GACCCTAGTC	11	9	81. 82
S501	TGCGGGTCCT	10	4	40
S503	ACACAGAGGG	8	2	25
S504	CCCGTAGCAC	8	3	37. 5
S505	GACCTAGTGG	5	3	60
S506	GTCTACGGCA	4	3	75
S507	ACTGGCCTGA	10	5	50
S508	CCCGTTGCCT	6	4	66. 7
S509	TGAGCACGAG	8	2	25
S510	CCATTCCCCA	8	3	37. 5
S511	GTAGCCGTCT	6	2	33. 3
S513	GGACGACAAG	8	2	25
S514	CAGGATTCCC	5	2	40
S515	GGACAACGAG	5	1	20
S516	CTCTGCGCGT	4	0	0
S517	CCGTACGTAG	13	10	76. 9
S519	CCTCCTCATC	3	1	33. 3
S520	ACGGCAAGGA	10	1	10
合 计		235	106	45. 11

表 2 用于 ISSR 扩增分析的随机引物序列及多态性
Tab. 2 Primers used and polymorphism of ISSR marker

引物	序列	统计条带数	多态性条带	多态位点百分率/ %
ISSR4	CCA(GT G) ₄	9	3	33. 3
ISSR7	CCC(GT) ₇	6	6	100
ISSR8	GCG(AC) ₆ A	8	7	87. 5
ISSR13	C(CA) ₈	9	4	44. 4
ISSR14	(CT) ₈ A	11	6	54. 5
ISSR16	(CT) ₈ T	9	4	44. 4
ISSR17	(CT) ₈ GC	2	2	100
ISSR18	(CT) ₈ AG	8	6	75
ISSR19	(CT) ₈ GA	9	7	77. 8
ISSR20	(TG) ₇ AC	8	6	75
ISSR23	(TC) ₇ GT G	10	6	60
ISSR27	(GA) ₇ AG	6	6	100
ISSR29	(GA) ₇ CA	4	1	25
ISSR34	(GA) ₇ TA	5	4	80
ISSR47	(GT) ₇ CG C	11	8	72. 7
ISSR48	(AC) ₇ G G G	4	0	0
合 计		119	76	63. 87

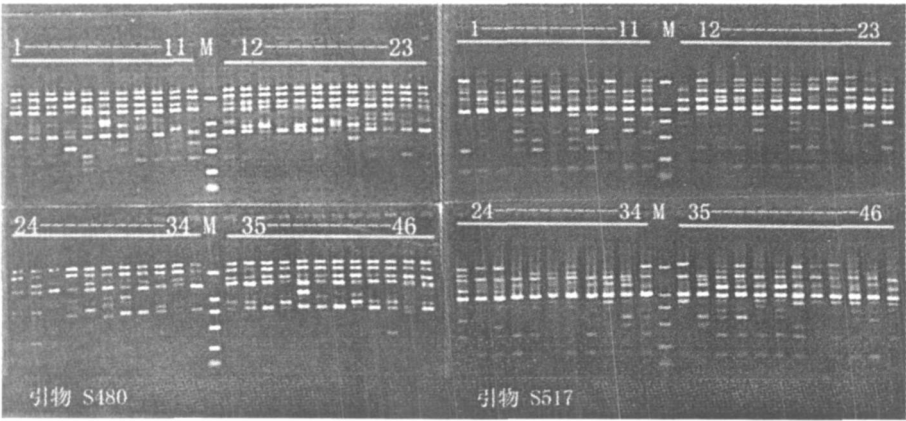


图 1 引物 S480 和 S517 对横带髯鲷的 RAPD 电泳图谱
M: DL2000 标记

Fig.1 RAPD patterns of wild stock of *Haplochromis mucronatus* by S480 and S517

为 45. 11%. 基于 RAPD 分析, 横带髯鲷厦门野生群体内个体间的遗传相似性系数 S 平均值为 0. 906 2, 群体内平均遗传距离 D 为 0. 093 8, Shannon's 遗传多样性指数 I 为 0. 243 0.

2. 2 横带髯鲷遗传多样性的 ISSR 分析

从 52 个 ISSR 引物中筛选出了 16 个重复性好, 条带清晰的引物, 对横带髯鲷厦门野生群体的 46 个 DNA 的遗传多样性进行 ISSR 检测, 引物编号及其序列见表 2. 图 2 为引物 ISSR14 和 ISSR23 对该野生群体 46 个个体 DNA 样品的扩增结果. 16 个 ISSR 引物

扩增出的条带数目 2~ 11 不等, 片断大小在 0. 25~ 2 kb 之间. 共扩增产生了 119 个可统计的条带, 其中具有多态性的条带 76 个, 多态位点百分率为 63. 78%. 基于 ISSR 分析, 该群体个体间的遗传相似性系数 S 平均值为 0. 868 5, 群体内平均遗传距离 D 为 0. 131 5, Shannon's 遗传多样性指数 I 为 0. 348 9.

3 讨 论

本研究中所用 ISSR 方法是由 Zietkiewicz 等人于 1994 年创建的一种 DNA 标记技术^[6], 其特性与

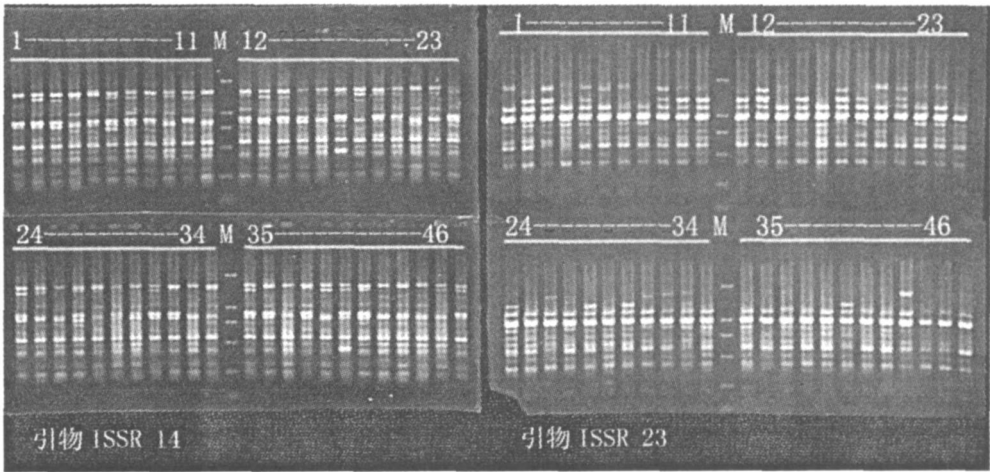


图 2 引物 ISSR 14 和 ISSR23 对 46 个个体基因组 DNA 的 ISSR 电泳图
M: DL2000 标记

Fig. 2 SSR patterns of wild stock of *Hapalogenys mucronatus* by ISSR 23 and ISSR 23

RAPD 技术有一定类似, 两者所用引物都无明显种属特异性, 扩增的条带符合孟德尔遗传规律. 由于两者都是显性标记, 在进行群体遗传学评估时也采用同样的遗传参数计算方法, 因此所得的遗传参数间有一定的可比性^[7]. 我们在横带髯鲷检测中发现 ISSR 具有比 RAPD 更高的多态位点检出率以及较高的遗传变异 (表 3), 这点在绝大多数研究中也得到证实^[8-10]. 这可能是由于 ISSR 技术检测的是位于反相排列的 SSR 之间的 DNA 序列, 不同于 RAPD 技术检测整个基因组, 而且 SSR 散布于整个真核生物基因组中, 且比非重复序列具有较快的变异速率, 从而导致 ISSR 比 RAPD 检测到更多的基因组位点差异, 这也是 ISSR 标记技术在物种遗传多样性、群体遗传学等方面更具有潜在研究价值的一个主要原因. 此外, 由于 ISSR 对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD, 而在重复性和稳定性上均强于 RAPD, 可以认为在鱼类遗传多样性分析中, ISSR 较 RAPD 技术具有一定的优越性.

此外, 我们将横带髯鲷 RAPD 和 ISSR 检测数据

与部分鱼类的 RAPD、ISSR 分析数据进行类比 (表 4). 横向比较的结果显示: 基于 RAPD 的检测数据, 横带髯鲷的遗传多样性仅低于青海湖裸鲤和军曹鱼, 与小带鱼和花鲈基本持平, 略高于唐鱼、刀鲚和斜带髯鲷, 显著高于表 4 所列的其它鱼类; 基于 ISSR 的检测数据, 在表 4 所列的种类中, 横带髯鲷的遗传多样性最高. 综合以上比较结果可以看出, 横带髯鲷种群的遗传多样性仍处于较高的水平.

作为港澳台、日本和东南亚地区正在推广的新兴食用鱼, 横带髯鲷野生资源总量偏小. 开展人工繁育的研究是提高其产量, 进一步扩大经济效益的主要途径. 随着水产养殖业的发展, 如何保护其野生资源的可持续利用, 最大限度地保持养殖群体的遗传多样性, 已成为人们关注的问题. 本研究结合 RAPD 和 ISSR 2 种分子标记方法, 分析了横带髯鲷厦门近海野生群体遗传多样性水平, 研究结果为横带髯鲷的遗传背景研究奠定了基础, 为其未来的人工繁育和野生资源的保护提供理论依据和科学指导.

表 3 基于 RAPD 和 ISSR 的横带髯鲷遗传多样性评估结果
Tab. 3 Genetic diversity of *Hapalogenys mucronatus* based on RAPD and ISSR data

	多态位点百分率 $P/\%$	遗传距离 D	遗传相似系数 S	Shannon 多样性指数 I
RAPD	45.11	0.0938	0.9062	0.2430
ISSR	63.87	0.1315	0.8685	0.3489

表 4 横带髯鲷与其它鱼类的遗传多样性比较

Tab. 4 Comparison of the genetic diversity of *Haplochromis macleoti* with others fishes

种类	基于 RAPD 的 Shannon's 信息指数	基于 ISSR 的 Shannon's 信息指数
青海湖裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii</i>	0.4861 ^[11]	
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	0.4498 ^[12]	
小带鱼 <i>Eupleurogrammus muticus</i>	0.2565 ^[13]	
花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i> : 日照群体	0.2479 ^[14]	
厦门群体	0.2431 ^[14]	
唐鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	0.23 ^[15]	
江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i> : 长江群体		0.2223 ^[16]
渤海群体		0.2059 ^[16]
刀鲚 <i>Coilia ectenes</i> : 群体 1	0.2044 ^[17]	0.1366 ^[17]
群体 2	0.1863 ^[17]	0.1196 ^[17]
群体 3	0.2238 ^[17]	0.1156 ^[17]
斜带髯鲷 <i>Haplochromis nitens</i>	0.2127 ^[18]	0.2719 ^[18]
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i> : 金口群体	0.2057 ^[19]	
瑞昌群体	0.1483 ^[19]	
湘江群体	0.1821 ^[19]	
带鱼 <i>Trichiurus lepturus</i>	0.1575 ^[13]	
文昌鱼 <i>Branchiostoma balcheri</i>	0.1519 ^[20]	0.06~ 0.51 ^[21]
牙鲆 <i>Paralichthys lethostigma</i>	0.1120 ^[22]	0.1432 ^[23]
小黄鱼 <i>Pseudosciaena polyactis</i>	0.69 ^[24]	0.1888 ^[25]
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> : A 群体	0.0918 ^[26]	
B 群体	0.0670 ^[26]	
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	0.0624 ^[27]	
大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	0.0592 ^[28]	
鳙 <i>Aristichthys nobilis</i>	0.0532 ^[29]	
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	0.0466 ^[30]	
中华鲟 <i>Acipenser sinensis</i>	0.0334 ^[31]	
横带髯鲷 <i>Haplochromis macleoti</i> (本研究)	0.2430	0.3489

参考文献:

[1] 福建鱼类志编写组. 福建鱼类志(下卷)[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1985: 196– 198.

[2] 喻子牛, 孔晓瑜, 徐文武, 等. 斜带髯鲷 *Haplochromis nitens* (Richardson) 和横带髯鲷 *H. macleoti* (Eydoux et Souleyet) 的核型[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(2): 175– 180.

[3] 史海东, 毛国民, 王海岳. 温度和盐度对横带髯鲷胚胎发育的影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(3): 230– 234.

[4] 梁君荣. 花尾胡椒鲷(*Plectorhynchus cinctus*) 种质资源及其变异种的特异性分子标记[D]. 厦门: 厦门大学, 2002.

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Now York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 672– 683, 955.

[6] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 408– 417.

[7] Mattioni C, Casasoli M, Gonzalez M, et al. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2002, 14(6/ 7): 1064– 1070.

[8] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 440– 449.

[9] 钱 韦, 葛 颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42: 741– 750.

[10] Mattioni C, Casasoli M, Gonzalez M, et al. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 1064– 1070.

- [11] 张春霖, 陈大庆, 史建全, 等. 青海湖裸鲤繁殖群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 307–312.
- [12] 刘楚吾, 刘丽, 王中铎, 等. 军曹鱼的分子遗传特性研究[J]. 热带海洋学报, 2005, 24(1): 77–85.
- [13] 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海带鱼、小带鱼 RAPD 和线粒体 16S rRNA 基因序列变异分析[J]. 自然科学进展, 2003, 13(11): 1170–1176.
- [14] 李明云, 赵明忠, 钟爱华, 等. 山东日照和福建厦门沿海花鲈(*Lateolabrax japonicus*) 遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6): 618–624.
- [15] 舒琥, 蒙子宁, 易祖盛, 等. 唐鱼野生与人工繁育群体遗传多样性的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(1): 77–81.
- [16] 李东明, 林刚, 郑劲松, 等. 两个不同江豚群体 ISSR 遗传多样性初步分析[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2005, 29(6): 546–550.
- [17] 张媛, 胡则辉, 周志刚, 等. 利用 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 标记技术分析长江口刀鲚的群体遗传结构[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 390–397.
- [18] 王世锋, 杜佳莹, 苏永全, 等. 斜带髭鲷野生群体与养殖群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(4): 105–110.
- [19] 方耀林, 余来宁, 许映芳, 等. 长江水系青鱼遗传多样性的研究[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(1): 26–29.
- [20] 王奕华, 张士瑾, 刘振辉. 青岛文昌鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 21–27.
- [21] Zhou H T, Gao Y Y, Chen X, et al. Study on genetic diversity and resource conservation of amphioxus (*Branchiostoma balcheri* Gray) population[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 24(2): 102–112.
- [22] You Feng, Xiang Jianhai, Song Linsheng, et al. Genetic variations in natural and culture stocks of Shandong *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) as revealed by RAPD[J]. Studia Marina Sinica, 2002, 44: 228–234.
- [23] Liu Yunguo, Chen Songlin, Li Jing, et al. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers[J]. Aquaculture, 2006, 255: 565–572.
- [24] 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 2003, 11(3): 197–203.
- [25] 许广平, 仲霞铭, 丁亚平, 等. 黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(11): 34–38.
- [26] 宋平, 潘云峰, 向筑, 等. 黄颡鱼 RAPD 标记及其遗传多样性的初步分析[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2001, 47(2): 233–237.
- [27] 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: 7–14.
- [28] 金春华, 钟爱华, 黄福勇, 等. 大弹涂鱼自然种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2004, 28(12): 26–30.
- [29] 张德春, 张锡元, 杨代淑, 等. 长江鳊遗传多样性的研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1999, 45(6): 858–861.
- [30] 张德春, 余来宁, 方耀林. 草鱼自然群体和人工繁殖群体遗传多样性的研究[J]. 淡水渔业, 2004, 34(4): 5–7.
- [31] 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 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.

Study on the Genetic Structure of the Wild Stock of *Hapalogenys mucronatus* in Xiamen Bay

WANG Shi-feng, DU Jia-ying, SU Yong-quan, DING Shao-xiong, WANG Jun*

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Hapalogenys mucronatus* is a bottom associated fish generally found in warm temperate seas. It is mainly distributed in the western North Pacific Ocean, including the coasts of China, Korea, Japan and Philippines. As an excellent food fish, *Hapalogenys mucronatus* is highly valued in the local markets, and has a great potential for farm rearing and reproduction. To provide the genetic information of this species, the genetic diversity of 46 individuals from the wild stock of *Hapalogenys mucronatus* in Xiamen bay was investigated by using the inter simple sequence repeat (ISSR) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Of the random primers screened, 31 primers produced highly reproducible RAPD bands. A total of 235 discernible DNA fragments were detected, of which 106 being polymorphic. The percentage of polymorphic loci was 45.11% and Shannon's index was 0.243 0. Of the primers screened, 16 primers produced highly reproducible ISSR bands. A total of 119 discernible DNA fragments were detected, of which 76 being polymorphic. The percentage of polymorphic loci was 63.78% and Shannon's index was 0.348 9. Compared with other fishes, the genetic diversity of *H. mucronatus* in Xiamen is above the middle level, with a higher genetic diversity.

Key words: *Hapalogenys mucronatus*; genetic diversity; RAPD; ISSR