

# 半滑舌鳎和塞内加尔鳎养殖群体 遗传变异的 RAPD 分析

杨 奔<sup>1,2</sup>, 尤 锋<sup>1\*</sup>, 李 军<sup>1</sup>, 吴志昊<sup>1</sup>, 王 波<sup>3</sup>, 徐冬冬<sup>1</sup>, 于道德<sup>1</sup>,  
倪 静<sup>1</sup>, 徐世宏<sup>1</sup>, 徐永立<sup>1</sup>, 张培军<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 哈尔滨工业大学(威海), 山东 威海 264209;  
3. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

**摘 要:**采用 RAPD 方法对半滑舌鳎和塞内加尔鳎的养殖群体进行遗传变异分析。从 78 条随机引物中筛选出 20 条用于群体遗传学分析, 2 个群体共扩增出 260 条 DNA 片段, 其中半滑舌鳎 187 条, 塞内加尔鳎 180 条, 片段大小为 200~2 000 bp。半滑舌鳎和塞内加尔鳎养殖群体的多态片段比例分别为 63.10% 和 60.56%, Nei 的多样性指数和 Shannon 的信息指数分别为 0.266 4 和 0.237 5, 0.385 2 和 0.349 8。与其它鲆鲽鱼类养殖群体相比, 半滑舌鳎和塞内加尔鳎养殖群体的遗传多样性水平略低; 2 种鱼群体间的遗传相似性系数和遗传距离分别为 0.458 3 和 0.723 1, 它们的遗传变异主要来自群体内。

**关键词:**半滑舌鳎; 塞内加尔鳎; 养殖群体; RAPD; 遗传变异

**中图分类号:**Q347

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-6647(2008)04-0506-06

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes) 鲽形目(Pleuronectiformes) 鳎亚目(Soleoidei) 舌鳎科(Cynoglossidae) 舌鳎属(*Cynoglossus*)<sup>[1]</sup>, 俗称鳎米、龙利、龙舌、牛舌头, 英文名 tongue sole, 为我国近海常见的暖温性底层大型经济鱼类。分布于我国以及朝鲜半岛、日本近海和俄罗斯远东海域<sup>[2]</sup>, 其中我国以渤海、黄海海域为主。其味道鲜美, 为名贵海水鱼类, 其育苗和养成均已规模化, 具有很大的养殖前景。塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*) 隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes) 鲽形目(Pleuronectiformes) 鳎亚目(Soleoidei) 鳎科(Soleidae) 鳎属(*Solea*), 也称宝宝鱼、皇帝鱼, 英文名 senegal sole, 自然分布于欧洲南部法国比斯开湾、西班牙和葡萄牙等国沿岸<sup>[3]</sup>, 故又称其为欧鳎。2003 年前后首次由欧洲引入我国, 并开始规模化的繁殖与养殖。

国内对半滑舌鳎的研究多集中于繁殖育苗养成<sup>[4,5]</sup>和染色体核型<sup>[2]</sup>等研究, 有关群体遗传学研究, 有韩志强等采用 AFLP、RAPD 和线粒体细胞色素 b 基因(Cytb) 片段序列分析技术对 2 个半滑舌鳎野生群体和 1 个养殖群体遗传变异的研究<sup>[6]</sup>, 还有庄志猛等采用同工酶方法对半滑舌鳎 2 个野生群体的遗传多样性研究<sup>[7]</sup>。有关塞内加尔鳎群体遗传多样性研究在国内几乎没有见到, 在其原产地欧洲, 对其遗传多样性的研究也较少, 仅见 Funes 等<sup>[8]</sup>于 2004 年用微卫星标记分析了其群体遗传多样性。因为对这 2 种鳎的遗传背景知识还所知较少, 因而, 很有必要对它们进行更深入和广泛的群体遗传学研究。

本研究采用 RAPD 分析技术, 从 DNA 水平上对半滑舌鳎和塞内加尔鳎养殖群体的遗传多样性进行研究, 以期了解其遗传多样性背景、群体内和群体间遗传分化水平, 为其生物资源的种质保存、遗传改良及进一步的开发利用提供科学依据。

收稿日期: 2007-10-11

资助项目: 国家高技术研究发展计划探索课题——鲆鲽类高产、抗逆品种的培育(2006AA10A404); 国家自然科学基金项目——外源因子影响鲆鲽鱼类性别决定形成的研究(30571445)

作者简介: 杨 奔(1985-), 男, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事鱼类遗传学方面研究。

\* 通讯作者, E-mail: youfeng@ms. qdio. ac. cn

(高 峻 编辑)

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和 DNA 的提取

半滑舌鲷和塞内加尔鲷养殖群体样本于 2006 年 11 月取自威海南洋生物技术有限公司养鱼场,均为活体。每群体各取 30 尾鱼,每尾鱼经过形态学测量、解剖后,取其肌肉放入样本袋中,立即置于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存至 2007 年 2—5 月进行分析。半滑舌鲷所取样本平均全长为  $(21.7\pm 3.4)\text{ mm}$ ;塞内加尔鲷所取样本平均全长为  $(79.3\pm 8.2)\text{ mm}$ 。样品总 DNA 的提取参照汪永庆的高盐法<sup>[9]</sup>,获得的总 DNA 用质量浓度为  $10\text{ g/L}$  的琼脂糖凝胶电泳检测,Beckman DU-650 型紫外分光光度计测定浓度和质量,并稀释到一定浓度后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 随机引物的筛选及 RAPD 分析

PCR 反应体系均为  $25\text{ }\mu\text{L}$ ,包括  $1\times$ PCR 反应缓冲液, $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  的 dNTPs, $2.0\text{ mmol/L}$  的  $\text{MgCl}_2$ , $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$  的引物,1 个单位的 Taq DNA 聚合酶(上海 Promega 公司),50 ng 的模板 DNA。扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,反应共 45 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 扩增在 Eppendorf Mastercycler PCR 扩增仪上进行。PCR 产物于质量浓度为  $10\text{ g/L}$  的琼脂糖凝胶中进行电泳检测,用 TM VDS-CL 型紫外成像系统(Pharmacia Biotech 有限公司)成像。每次电泳都有标准分子标记和空白对照。

通过 PCR,以扩增产物条带的有无、强弱、个体内一致性等为标准对 78 条 10 个碱基的随机引物(上海生工公司)进行筛选,最终选择扩增片段清晰、个体内一致性强、重复性高的引物用于群体分析。

### 1.3 数据统计和分析

在电泳条带中相同的迁移位置,将 DNA 片段的“有”和“无”分别定义为“1”和“0”,所有数据统计后成矩阵。采用 POPGENE 软件<sup>[10]</sup>计算了多态性片段比例、Nei 基因多样性指数、Shannon 遗传多样性指数、遗传相似性指数和遗传距离,图 1 中“M”为 DL2000 标记。

## 2 结果和分析

### 2.1 随机引物的筛选及扩增结果

经过筛选,78 条随机引物中有 20 条能够得到清晰、稳定和可重复的扩增片段,而被用于群体的遗传变异试验,表 1 为筛选用于群体分析的引物序列;其余 58 条引物的扩增图谱不是很清晰或重复性差,而未被选做群体分析。2 种鲷养殖群体共扩增出 260 条片段,其中半滑舌鲷养殖群体和塞内加尔鲷养殖群体的扩增片段数分别为 187 和 180 条,片段为  $200\sim 2\text{ }000\text{ bp}$ ,大多数片段分布在  $250\sim 1\text{ }500\text{ bp}$ 。每条引物扩增的片段数为 7~16 条,平均为 13 条。2 个群体的扩增图谱见图 1。

### 2.2 群体遗传变异分析

半滑舌鲷和塞内加尔鲷养殖群体内的遗传参数统计结果见表 2。分析看出,塞内加尔鲷养殖群体的 Nei 多样性指数和 Shannon 信息指数均略低于半滑舌鲷养殖群体。

表 1 用于半滑舌鲷和塞内加尔鲷养殖群体 RAPD 分析的引物序列和扩增结果

Table 1 Sequences and amplified results of the RAPD analysis of primers from cultured stocks of *Cynoglossus semilaevis* and *Solea senegalensis*

| 引物代码 | 引物序列(5'-3') | 总扩增<br>片段数 | 半滑舌鲷<br>特有片段数 | 塞内加尔鲷<br>特有片段数 | 引物代码 | 引物序列(5'-3') | 总扩增<br>片段数 | 半滑舌鲷<br>特有片段数 | 塞内加尔鲷<br>特有片段数 |
|------|-------------|------------|---------------|----------------|------|-------------|------------|---------------|----------------|
| S1   | GTTTCGCTCC  | 16         | 6             | 5              | S156 | GGTGACTGTG  | 15         | 6             | 3              |
| S27  | GAAACGGGTG  | 11         | 3             | 1              | S165 | TGTTCCACGG  | 7          | 5             | 0              |
| S69  | CTCACCGTCC  | 13         | 5             | 3              | S171 | ACATGCCGTG  | 10         | 3             | 3              |
| S77  | TTCCCCCAG   | 14         | 3             | 3              | S172 | AGAGGGCACA  | 15         | 5             | 5              |
| S85  | CTGAGACGGA  | 15         | 3             | 5              | S173 | CTGGGGCTGA  | 16         | 7             | 4              |
| S89  | CTGACGTCAC  | 15         | 6             | 4              | S187 | TCCGATGCTG  | 16         | 4             | 7              |
| S90  | AGGGCCGTCT  | 15         | 2             | 3              | S189 | TCCTGGTCCC  | 8          | 2             | 2              |
| S94  | GGATGAGACC  | 11         | 2             | 3              | S192 | CTGGGTGAGT  | 14         | 7             | 6              |
| S133 | GGCTGCAGAA  | 14         | 2             | 4              | S196 | AGGGGGTTCC  | 8          | 2             | 3              |
| S134 | TGCTGCAGGT  | 13         | 2             | 4              | S199 | GAGTCAGCAG  | 14         | 6             | 5              |

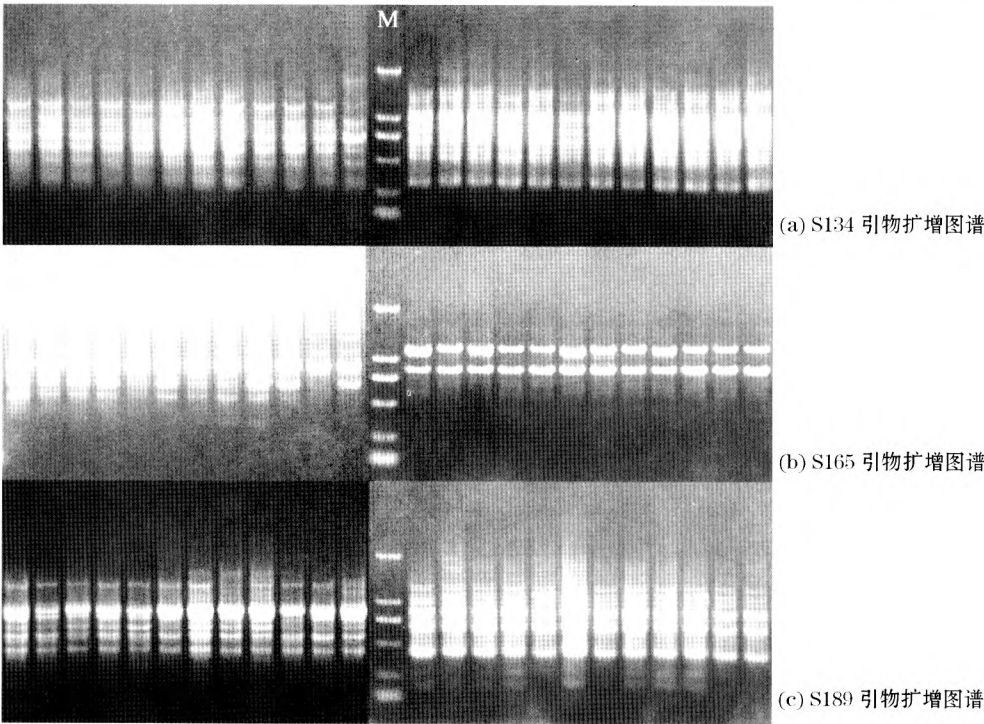


图 1 半滑舌鲷(左)和塞内加尔鲷(右)养殖群体 RAPD 扩增图谱

Fig. 1 Amplified electrophoretic pattern of RAPD markers for cultured stocks of *Synoglossus semilaevis*(left) and *Solea senegalensis*(right)

表 2 半滑舌鲷和塞内加尔鲷养殖群体的 RAPD 片段数和遗传多样性指数

Table 2 RAPD band number and genetic diversity indexes for cultured stocks of *Cynoglossus semilaevis* and *Solea senegalensis*

| 养殖群体名称 | 总片段数 | 多态片段数 | 多态片段比例/% | Nei 的多样性指数 | Shannon 的信息指数 |
|--------|------|-------|----------|------------|---------------|
| 半滑舌鲷   | 187  | 118   | 63.10    | 0.266 4    | 0.385 2       |
| 塞内加尔鲷  | 180  | 109   | 60.56    | 0.237 5    | 0.349 8       |

2.3 群体遗传距离及亲缘关系分析

根据 Nei 的非偏差方法计算的半滑舌鲷和塞内加尔鲷养殖群体间的遗传相似性系数和遗传距离分别为 0.458 3 和 0.723 1。

3 讨 论

通过 RAPD 标记对半滑舌鲷和塞内加尔鲷养殖群体的遗传多样性进行了分析,其中多态片段比例、Nei 多样性指数和 Shannon 信息指数是能够有效反映鱼类种群遗传变异及其种质资源状况的 3 个重要参数,半滑舌鲷和塞内加尔鲷的 3 项指数分别为 63.10%和 60.56%,0.266 4 和 0.237 5,0.385 2 和 0.349 8。将其与其他学者对一些鲆鲽鱼类(包括半滑舌鲷)的 RAPD 分析结果进行对比(表 3)。

表 3 9 种鲆鲽鱼类的 RAPD 分析结果  
Table 3 RAPD analysis results of the 9 flatfish species

| 鲆鲽鱼类       | 多态片段比例/%    | Nei 的多样性指数      | Shannon 的信息指数   | 文 献  |
|------------|-------------|-----------------|-----------------|------|
| 半滑舌鲷养殖群体   | 63.10       | 0.266 4         | 0.385 2         | 本文   |
| 塞内加尔鲷养殖群体  | 60.56       | 0.237 5         | 0.349 8         | 本文   |
| 半滑舌鲷黄海野生群体 | 80.00       | 0.252 6         | 0.381 3         | [6]  |
| 半滑舌鲷渤海野生群体 | 76.00       | 0.252 4         | 0.379 3         | [6]  |
| 半滑舌鲷养殖群体   | 74.00       | 0.242 2         | 0.366 5         | [6]  |
| 漠斑牙鲆养殖群体   | 66.23       | 0.386 2         | 无               | [11] |
| 星斑川鲽养殖群体   | 62.41       | 0.316 6         | 0.21            | [12] |
| 牙鲆养殖群体     | 34.90       | 0.225 5         | 0.094 2         | [13] |
| 大菱鲆进口养殖苗种  | 12.80~20.00 | 0.014 2~0.035 2 | 0.042 3~0.072 0 | [14] |

本文的半滑舌鲷养殖群体的遗传多样性指数与已报道的半滑舌鲷 2 个野生群体及 1 个养殖群体 RAPD 的分析结果<sup>[6]</sup>相比,尽管多态片段比例下降较明显,但其它 2 个参数的数值下降幅度却不大,甚至略高。表中的半滑舌鲷养殖群体<sup>[6]</sup>和漠斑牙鲆、星斑川鲽养殖群体均为人工养殖的子一代<sup>[11,12]</sup>,即它们的亲本群体都是野生的,其遗传多样性水平与野生群体相比都有所下降;而牙鲆养殖群体和大菱鲆进口养殖苗种群体,其亲本中已大量掺杂多代养殖个体,形成了累代养殖,故遗传多样性水平相对较低。

RAPD 分子标记技术因其操作简便、省时、省力、消耗低、可以同时分析大量的样本。尽管为显性标记,具有一定的局限性,但在开始分析一种生物,对其遗传背景(如鱼类的遗传多样性)一无所知时,可以首先通过快速的 RAPD 分析,在较短的时间内得到较多的遗传变异信息<sup>[15]</sup>,但前提是需要筛选较多的引物和获得重复性较高的结果。本文经筛选采用了 20 条引物进行这 2 种鱼的养殖群体分析,获得了 187 条和 180 条带,由此获得的遗传参数在一定程度上反映研究群体变异水平。

有关塞内加尔鲷及其相近种欧鲷(*Solea vulgaris*)的群体遗传多样性研究在欧洲已有一些报道,西班牙学者 Funes 等<sup>[8]</sup>于 2004 年用 10 对微卫星引物分析了塞内加尔鲷养殖群体和野生群体的遗传多样性,其野生群体的观察杂合度与预期杂合度分别为 0.27~0.87 和 0.66~0.94,都高于养殖群体的 0.19~0.91 和 0.72~0.97。意大利学者 Garoia 等<sup>[16]</sup>于 2007 年用 15 对微卫星引物分析了地中海 4 个不同海区欧鲷野生群体的遗传多样性,其观察杂合度与预期杂合度分别为 0.392~0.775 和 0.341~0.927。这些结果都显示出所分析的塞内加尔鲷和欧鲷群体的杂合度偏低,研究者认为是由近交繁殖所引起的。

本文所用塞内加尔鲷养殖群体为于 2004 年引自法国的养殖子一代,通过 RAPD 分析获得的参数与其它一些鲆鲽鱼群体的 RAPD 分析获得的遗传学参数相比较低,认为该鱼群体的遗传多样性水平偏低。同

样,已有的 AFLP 分析报道显示,半滑舌鲷的野生和养殖群体的遗传多样性参数都很低,尽管前者要略高于后者<sup>[6]</sup>;同工酶的结果也显示其黄海和渤海野生群体的杂合度等参数数值都偏低<sup>[7]</sup>,本文的半滑舌鲷养殖群体的遗传多样性参数与其它鲆鱼养殖群体相比,也处于较低水平,因此,对于我国半滑舌鲷和塞内加尔鲷的养殖,应加强养殖中亲本群体的遗传管理,切实维持育苗亲本的适当大小、定期更换亲鱼、避免累代养殖,来维持群体遗传多样性水平,确保其养殖健康和可持续发展。

致谢:本文样品的采集得到威海南洋生物技术有限公司养鱼场石峰经理的大力帮助。

## 参考文献(References):

- [1] LI S Z, WANG H M. FAUNA SINICA; Ostichthyes Pleuronectiformes[M]. Beijing: Science Press, 1995; 364-366. 李思忠,王惠民. 中国动物志:硬骨鱼纲鲆形目[M]. 北京:科学出版社, 1995; 364-366.
- [2] ZHOU L Q, YANG A G, LIU X Z, et al. The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(3): 417-419. 周丽青,杨爱国,柳学周,等. 半滑舌鲷染色体核型分析[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 417-419.
- [3] QUERO J, DESOUTTER M, LAGARDERE F. Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean[M]. UNESCO; Bungay, UK, 1986; 1308-1328.
- [4] LIU X Z, ZHUANG Z M, MA A J, et al. Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(5): 7-14. 柳学周,庄志猛,马爱军,等. 半滑舌鲷养殖生物学及繁殖技术研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 7-14.
- [5] MA A J, LIU X Z, XU Y J, et al. Study on feeding behavior and growth of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in early development stage[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(2): 130-138. 马爱军,柳学周,徐永江,等. 半滑舌鲷早期发育阶段的摄食特征及生长研究[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(2): 130-138.
- [6] HAN Z Q, ZHUANG Z M, GAO T X, et al. Genetic diversity in *Cynoglossus semilaevis* by AFLP, RAPD and mtDNA markers[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 192-200. 韩志强,庄志猛,高天翔,等. 半滑舌鲷 DNA 的群体遗传变异[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 192-200.
- [7] ZHUANG Z M, HAN Z Q, MA A J, et al. Genetic diversities in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) as revealed by isozyme analysis[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 10-16. 庄志猛,韩志强,马爱军,等. 黄、渤海半滑舌鲷种群遗传结构的同工酶分析[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 10-16.
- [8] FUNES V, ZUASTI E, CATANESE G, et al. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup)[J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 339-341.
- [9] WANG Y Q, WANG X G, XU L X, et al. A new rapid method for extraction of high quality of genomic DNA from animal tissue[J]. Chinese Journal of Zoology, 2001, 36(1): 27-29. 汪永庆,王新国,徐来祥,等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进[J]. 动物学杂志, 2001, 36(1): 27-29.
- [10] YE H F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE Version 1.31[EB/OL]// Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis; Quick User Guide. Canada: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999[2007-10-11]. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.
- [11] YOU F, WU Z H, WANG W, et al. Primary analysis on genetic diversity in cultured stock of *Paralichthys lethostigma*[J]. Marine Sciences, 2006, 30(2): 86-90. 尤锋,吴志昊,王伟,等. 漠斑牙鲆养殖群体 RAPD 遗传多样性的初步分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(2): 86-90.
- [12] YOU F, WU Z H, LI J, et al. RAPD Analysis of Genetic Diversity in Cultured Stock of *Platichthys stellatus*[J]. Advances in Marine Science, 2007, 25(1): 73-78. 尤锋,吴志昊,李军,等. 星斑川鲆(*Platichthys stellatus*)养殖群体的 RAPD 分析[J]. 海洋科学进展, 2007, 25(1): 73-78.
- [13] YOU F, WANG K L, XIANG J H, et al. Comparative analysis of biochemical genetic structure and variance between natural and cultured stocks on the left-eyed flounder *Paralichthys lethostigma* (T. & S.) off Shandong coastal waters[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32(5): 512-518. 尤锋,王可玲,相建海,等. 山东近海褐牙鲆自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(5): 512-518.
- [14] SHEN X Y, GONG Q L, LEI J L, et al. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus* L. using RAPD and microsatellite technique[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2004, 35(4): 332-341. 申雪艳,官庆礼,雷霖霖,等. 进

口大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 332-341.

- [15] BOWDITCH B M, ALBRIGHT D G, JOHN G K. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies [J]. *Methods in Enzymology*, 1993, 224: 294-309.
- [16] GAROIA F, GUARNIERO I, GRIFONI D, et al. Comparative analysis of AFLPs and SSRs efficiency in resolving population genetic structure of Mediterranean *Solea vulgaris* [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(7): 1377-1387.

## RAPD Analysis of Genetic Variability in Two Cultured Stocks of *Cynoglossus semilaevis* and *Solea senegalensis*

YANG Ben<sup>1,2</sup>, YOU Feng<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, WU Zhi-hao<sup>1</sup>, WANG Bo<sup>3</sup>, XU Dong-dong<sup>1</sup>, YU Dao-de<sup>1</sup>,

NI Jing<sup>1</sup>, XU Shi-hong<sup>1</sup>, XU Yong-li<sup>1</sup>, ZHANG Pei-jun<sup>1</sup>

(1. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;*

2. *Harbin Institute of Technology (Weihai), Weihai 264209, China;*

3. *First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China)*

**Abstract:** The RAPD technology was used to analyze the genetic variation of cultured stocks of *Cynoglossus semilaevis* and *Solea senegalensis*. Out of 78 random oligonucleotide primers, 20 primers were selected for stock genetics analysis. Total 260 bands were amplified, including 187 of *Cynoglossus semilaevis* and 180 of *Solea senegalensis*, ranging between 200 and 2 000 bp. The percentage values of polymorphic bands of these two stocks were respectively 63.10% and 60.56%, and their Ne's genetic diversity values were 0.266 4 and 0.237 5, respectively, while their Shannon indexes were 0.385 2 and 0.349 8. The results suggested that the genetic variabilities of these two cultured stocks were a little lower than those of cultured stocks of other flatfish. The genetic similarity and genetic distance between these two cultured stocks were 0.458 3 and 0.723 1, respectively. And the most genetic variability take place in the corresponding stock.

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis*; *Solea senegalensis*; cultured stock; RAPD; genetic variation

**Received:** October 11, 2007