

应用 RAPD 技术对 6 种玻璃鳗的 种质鉴定和遗传多样性分析

张新艳 樊海平 范斯敏 卓玉琛 林煜 钟全福

(福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 运用随机多态性扩增 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、欧洲鳗鲡 (*A. anguilla*)、美洲鳗鲡 (*A. rostrata*)、花鳗鲡 (*A. marmorata*)、莫桑比克鳗鲡 (*A. mossambica*) 和西里伯斯鳗鲡 (*A. celebesensis*) 的遗传多样性进行研究, 分析比较 6 种鳗鲡的种间特异性、种间相似性和遗传距离。筛选出 14 个重复性好的 RAPD 随机引物, 分别用于 6 种鳗鲡基因组 DNA 的分析, 其中, 引物 S21、S28、S42 在 6 种鳗鲡中所产生的条带均有所差异, 可单独或组合作为 6 个鳗鲡品种鉴别的分子标记。应用 DPS 数据处理系统中的聚类分析软件包分析 6 种鳗鲡的遗传差异和亲缘关系。结果表明, 6 种鳗鲡群体间的遗传相似系数在 0.076 9~0.461 5, 差异显著 ($P < 0.05$), 美洲鳗鲡与欧洲鳗鲡之间的遗传距离最小, 为 0.538 5。依据群体间的遗传距离, 绘制鳗鲡遗传关系图谱, 6 种鳗鲡分为 2 类, 其中, 美洲鳗鲡与欧洲鳗鲡首先聚类, 西里伯斯鳗鲡与这两种鳗鲡聚为一类; 同时, 莫桑比克鳗鲡与花鳗鲡的亲缘关系较近, 而与日本鳗鲡的亲缘关系渐远, 这 3 种鳗鲡聚为一类。结果证实这 6 种鳗鲡进化分布主要受到地理结构和洋流的影响, 而并非只是单纯的地理位置上远近关系的影响, 为鳗鲡品种的快速鉴定和种质资源的研究奠定基础。

关键词: RAPD; 遗传标记; 玻璃鳗; 种质鉴定; 遗传多样性

中图分类号: S965.223 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0683-06

Identification of 6 Populations of Glass Eel Genetic Diversity Analysis by Means of Random DNA (RAPD)

ZHANG Xin-yan, FAN Hai-ping, FAN Si-min,
ZHUO Yu-chen, LIN Yu, ZHONG Quan-fu

(The Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers were applied to detect the genetic diversity and molecular evolution of 6 populations of glass eel included *Anguilla mossambica*, *A. japonica*, *A. marmorata*, *A. rostrata*, *A. anguilla* and *A. celebesensis*. 14 arbitrary primers screened out of 32 random primers were adopted to analyze the polymorphism in RAPD profiles, the random primers S21, S28 and S42 produced different bands in the 6 populations glass eel, which could be used to identify the stock. Total 89 markers were amplified in a range of 300-2200 bp, which were distinguishable and reproducible, 87 bands of them were polymorphic, about 97.75% of the total bands. Genetic distance coefficient analysis of different bands was carried out by statistical data software (DPS). The un-weighted pair-group method using arithmetic average

收稿日期: 2010-03-23 修回日期: 2010-05-19

基金项目: 福建省海洋与渔业科技项目 (闽财指[2009]58号)、福建省公益性行业(农业)科研专项经费项目 (nyhyzx07-043)

作者简介: 张新艳 (1980-), 硕士, 主要从事水产养殖动物病害研究, E-mail: swallowz47@163.com; * 通讯作者: 樊海平, E-mail: fanhaiping@tom.com。

(UPGMA) cluster analysis was used and dendrograms was protracted. The results showed as the following: the polymorphic loci ratio in *A. mossambica*, *A. japonica*, *A. marmorata*, *A. rostrata*, *A. Anguilla* and *A. celebesensis* were 34.83%, 26.96%, 22.47%, 26.96%, 13.48% and 31.46%, respectively. The mean genetic similarity indexes of intra-species (S) were 0.901 1, 0.889 9, 0.803 8, 0.701 1 and 0.788 7, respectively. The mean genetic distances of intra-species (D) were 0.098 9, 0.110 1, 0.196 2, 0.298 9 and 0.211 3, respectively. The mean genetic distances of inter-species (D_{xy}) were in a range of 0.538 5–0.923 3. The 6 populations glass eel were divided into 2 groups, the results confirmed the geographical distribution of the 6 glass eel, this can compensate the deficiency of the identification of the glass eel by shape.

Key words: RAPD; genetic markers; glass eel; genetic diversity; stock identification

全世界公认鳗鲡品种 19 种,除欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)和美洲鳗鲡(*A. rostrata*)分布于大西洋外,其余品种均分布于印度洋—太平洋沿岸^[1-3]。中国是世界上最大的鳗鲡养殖国度,养殖面积约 0.7 万 hm^2 ,年苗种需求总量约 100 t 以上,养殖的主要品种为日本鳗鲡(*A. japonica*)和欧洲鳗鲡,另有少量美洲鳗鲡和花鳗鲡(*A. marmorata*)的养殖。苗种资源的匮乏严重制约了我国鳗鲡养殖业的发展。近年部分养殖场开始引进美洲、澳洲以及东南亚(菲律宾或印尼等产地的鳗苗)产的鳗苗进行试养,鉴于商业利益,苗种供应商常对养殖场保密苗种来源,导致试养品种的分类地位无法确定,试养品种的生物学特性、生理生态等方面要求无法查阅相应参考文献,只能凭现有品种的养殖技术试养,新品种的养殖几乎均以失败告终,给养殖者造成了一定的经济损失,也为新品种养殖技术的发展带来困难^[4-7]。

玻璃鳗的传统鉴定方法主要根据产地、鳍型和脊椎骨数量等参数,产地是最重要的分类依据,根据鳗鲡的地理分布种类,参照鳍型、尾部色素和脊椎骨数量即能定种^[1]。随机扩增多态性 DNA 技术^[8](random amplified polymorphic DNA, RAPD)是建立于 PCR (polymerase chain reaction) 基础之上,可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子技术,目前已经被广泛运用于遗传多样性检测、系统学研究、动植物种类鉴定、遗传图谱构建、环境监测等领域,因此, RAPD 技术可拓展应用于水生动物品种鉴别、种间遗传多样性和相似性比较。福建省淡水水产研究所近年收集了我国常见养殖和引进试养的玻璃鳗品种,依据传统方法鉴定至种。本文将 RAPD 技术应用于玻璃鳗品种鉴定,以期筛选出适宜的遗传标记,建立分子生物学的玻璃鳗品种快速鉴别方法,并对研究品种的种间特异性、种间相似性和遗传距离进行分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 玻璃鳗 日本鳗鲡、欧洲鳗鲡、美洲鳗鲡、花鳗鲡(2组)、莫桑比克鳗鲡(*A. mossambica*)、西里伯斯鳗鲡(*A. celebesensis*)(2组)各 10 条,产地明确,由福建省淡水水产研究所水产动物病害控制研究室收集,传统方法鉴定至种, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.1.2 试剂 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购自 TIANGEN 公司;琼脂糖、*rTaq* 酶、dNTP Mixture、DNA Marker DL2000、250 bp DNA Ladder Marker 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;随机引物^[9]由鼎安测序公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 鳗鲡基因组 DNA 的制备 剪取玻璃鳗尾部 10~20 mg,按照 TIANGEN 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)说明书方法提取基因组 DNA, Libra S22 型紫外/可见分光光度计定量和 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.2.2 RAPD-PCR 反应 参照文献[10]的方法,反应在 Eppendorf mastercycler gradient PCR 仪上进行。每个样品分别加入 $10\times$ PCR buffer (Mg^{2+} plus) 2.5 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL , *rTaq* 酶 (5 U/ μL) 2 U, 随机引物 (10 mmol/L) 2 μL , DNA (20~200 ng/ μL) 1 μL , 用无菌超纯水补足反应体系至 25 μL 。扩增反应参数为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后再 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 反应循环 45 次, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应均设置不含 DNA 的空白对照。PCR 产物在 10 g/L

琼脂糖凝胶中电泳分离,用柯达凝胶成像系统记录分析。

1.2.3 数据处理 统计在琼脂糖凝胶上出现的 DNA 片段,同一电泳凝胶上,迁移率相同的都视为同一位点,无论强度明亮与否,只要清晰可见的都采用,按出现的记为“1”,不出现的记为“0”进行统计,将电泳图转化为 0,1 矩阵^[11]。

个体间的遗传相似系数的计算公式^[12]:

$$S = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y} \quad (1)$$

式中 N_{xy} 是个体 x 和 y 的共有条带数; N_x 和 N_y 分别是个体 x 和 y 的扩增条带数。

群体内的遗传距离计算公式^[13]: $D = 1 - S$ 。

群体间的遗传距离的公式^[14],采用 DPS 数据处理系统进行计算,遗传相似系数:

$$I = \frac{\sum(x_i y_i)}{\sum(x_i^2 y_i^2)} \quad (2)$$

式中 x_i, y_i 表示第 i 条带分别在群体 x, y 中出现的频率。

群体间的遗传距离: $D = -\ln I$ 。

群体内及群体间平均遗传相似系数、平均遗传距离及多态座位比例用 t -检验予以比较。

基于遗传距离 D ,采用 UPGMA(un-weighted pair group method using arithmetic average) 方法对 6 个鳗鲡群体进行聚类分析^[15]。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果及分子标记

分别以 6 种鳗鲡基因组 DNA 为模板进行 RAPD 引物筛选,共选出多态性高、条带清晰、重复性好、稳定性高且具有种间特异性引物 14 条(表 1),共扩增出条带 89 条,其中具多态性的条带有 87 条,每条引物产生的条带 1~9 条不等,产生的条带大小在 300~2 200 bp。

表 1 适用于鳗鲡鉴定的随机引物序列

Tab. 1 Sequences of random primers screened out for RAPD analysis of eels

引物编号 Primers code	序列 Sequence(5'→3')	引物编号 Primers code	序列 Sequence(5'→3')
S6	TGC TCT GCC C	S28	GTG ACG TAG G
S7	GGT GAC GCA G	S29	GGG TAA CGC C
S21	CAG GCC CTT C	S30	GTG ATC GCA G
S23	AGT CAG CCA C	S42	GGA CCC AAC C
S24	AAT CGG GCT G	S45	TGA GCG GAC A
S25	AGG GGT CTT G	S46	ACC TGA ACG G
S27	GAA ACG GGT G	S49	CTC TGG AGA C

将统计得到的 0-1 矩阵用 DPS 软件分析,计算各品种群体内平均遗传相似系数(S)和平均遗传距离(D)。表 2 表明 6 个群体的群内遗传相似系数在 0.701 1~0.901 1,说明随机选取的群体具有丰富的遗传多样性,可用于 RAPD 的研究。

试验获得了 6 种鳗鲡基因组 DNA 的 RAPD 图谱,图 1-图 4 为 S21 对部分鳗鲡的扩增结果。其中 S21、S28、S42 在各个鳗鲡群体产生的分子标记具有明显的种间特异性,可单独或组合用于鳗鲡品种鉴定(表 3)。

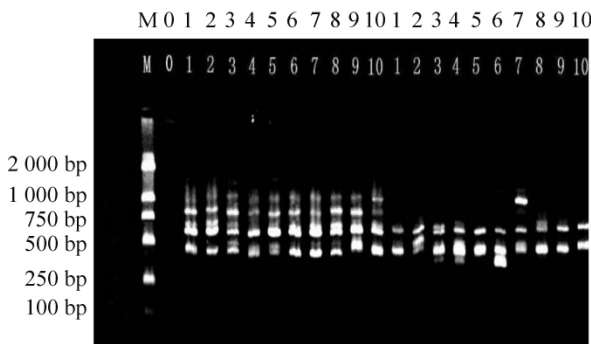
2.2 6 种鳗鲡的遗传多样性及聚类分析

参照 Nei^[16]的方法,计算出 6 种鳗鲡在 14 个引物中各群体间的遗传相似度和遗传距离(表 4)。结果表明 6 种鳗鲡群体间的遗传相似系数在 0.159 5~0.583 3,差异显著($P < 0.05$),美洲鳗鲡与欧洲鳗鲡之间的遗传距离最小,为 0.417 4,西里伯斯鳗鲡与欧洲鳗鲡的遗传距离最大,为 0.840 5。

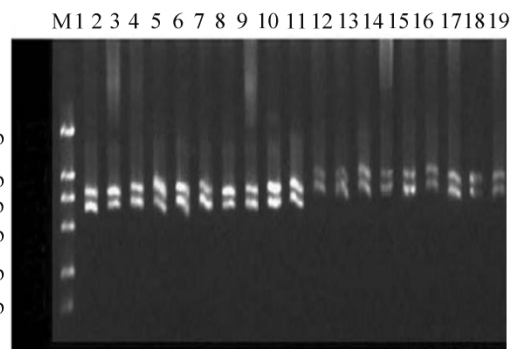
表 2 14 条随机引物在 6 个鳗鲡品种群体中 RAPD - PCR 扩增结果

Tab.2 Number of bands amplified by 14 random primers in 6 populations of ell

玻璃鳗品种 Species of glass eel	多态性条带数/条 Polymorphism bands	多态座位比例 P/% Percentage of polymorphism loci	平均遗传相似系数 S Mean genetic similarity index	平均遗传距离 D Mean genetic distances
莫桑比克鳗鲡 (<i>A. mossambica</i>)	31	34. 83	0. 901 1	0. 098 9
日本鳗鲡 (<i>A. japonica</i>)	24	26. 96	0. 863 1	0. 136 9
花鳗鲡 (<i>A. marmorata</i>)	20	22. 47	0. 889 9	0. 110 1
美洲鳗鲡 (<i>A. rostrata</i>)	24	26. 96	0. 803 8	0. 196 2
欧洲鳗鲡 (<i>A. anguilla</i>)	12	13. 48	0. 701 1	0. 298 9
西里伯斯鳗鲡 (<i>A. celebesensis</i>)	28	31. 46	0. 788 7	0. 211 3



M: DL 2000 DNA Marker; 0: 空白对照;
1 ~ 10 莫桑比克鳗鲡; 11 ~ 20 日本鳗鲡。
M: DL 2000 DNA Marker; 0: blank control;
1 ~ 10: *A. mossambica*; 11 ~ 20: *A. japonica*。
图 1 S21 在莫桑比克鳗鲡、日本鳗鲡的扩增结果
Fig. 1 The electrophoresis patterns by primer S21
in *A. mossambica* and *A. japonica*



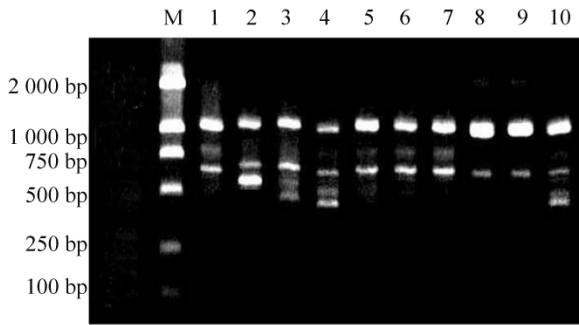
M: DL 2000 DNA Marker; 1 ~ 10: 美洲鳗鲡;
11 ~ 20: 欧洲鳗鲡。
M: DL 2000 DNA Marker;
1 ~ 10: *A. rostrata*; 11 ~ 20: *A. anguilla*。
图 2 S21 在美洲鳗鲡、欧洲鳗鲡的扩增结果
Fig. 2 The electrophoresis patterns by primer S21
in *A. Rostrata* and *A. Anguilla*

表 3 用于鉴别 6 种鳗鲡的 RAPD - PCR 标记

Tab.3 RAPD - PCR makers for identification of 6 populations eel

引物编号 Primers code	莫桑比克鳗鲡 <i>A. mossambica</i>	日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	花鳗鲡 <i>A. marmorata</i>	美洲鳗鲡 <i>A. rostrata</i>	欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	西里伯斯鳗鲡 <i>A. celebesensis</i>
S21	1 000 800 550 400	550 400	1 000 600	800 700	1 000 800	1 800
S28	1 500 1 000	1 000	1 500	750	1 000 700	750 400
S42	2 000 1 200 1 000 750	2 000 1 200 750	1 200 1 000	1 800 1 200	1 200	2 200 1 600 1 200

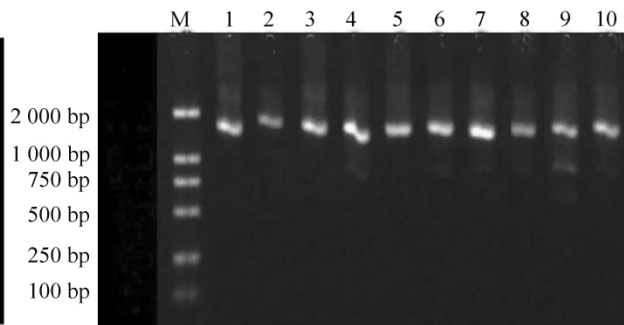
根据遗传距离 利用 DPS 数据处理系统最短距离法、类平均法 (UPGMA) 进行聚类分析 图 5 为 UPGMA 方法聚类图。



M: DL 2000 DNA Marker; 1~10: 花鳗鲡。
M: DL 2000 DNA Marker; 1~10: *A. marmorata*.

图 3 S21 在花鳗鲡中的扩增结果

Fig. 3 The electrophoresis patterns by primer S21 in *A. marmorata*



M: DL 2000 DNA Marker; 1~10: 西里伯斯曼丽。
M: DL 2000 DNA Marker; 1~10: *A. celebesensis*.

图 4 S21 在西里伯斯曼丽中的扩增结果

Fig. 4 The electrophoresis patterns by primer S21 in *A. celebesensis*

表 4 6 种鳗鲡群体间遗传相似系数及遗传距离

Tab. 4 Genetic similarities and genetic distance between 6 populations of ell

	莫桑比克鳗鲡 <i>A. mossambica</i>	日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	花鳗鲡 <i>A. marmorata</i>	美洲鳗鲡 <i>A. rostrata</i>	欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	西里伯斯鳗鲡 <i>A. celebesensis</i>
莫桑比克鳗鲡 <i>A. mossambica</i>		0. 476 2	0. 490 5	0. 195 2	0. 226 2	0. 252 4
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	0. 523 8		0. 433 3	0. 273 8	0. 333 3	0. 283 3
花鳗鲡 <i>A. marmorata</i>	0. 509 5	0. 566 7		0. 242 9	0. 266 7	0. 426 2
美洲鳗鲡 <i>A. rostrata</i>	0. 804 8	0. 726 2	0. 757 1		0. 583 3	0. 297 6
欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	0. 773 8	0. 666 7	0. 733 3	0. 416 7		0. 159 5
西里伯斯鳗鲡 <i>A. celebesensis</i>	0. 747 6	0. 716 7	0. 573 8	0. 7024	0. 840 5	

对角线右上方为遗传相似系数 对角线左下方为遗传距离。

The figures right above the diagonal represent genetic similarities left below the diagonal represent genetic distance.

由图 5 可知,6 种鳗鲡被分为 2 大类,美洲鳗鲡与欧洲鳗鲡首先聚类;同时,莫桑比克鳗鲡与花鳗鲡的亲缘关系较近,而与日本鳗鲡、西里伯斯鳗鲡的亲缘关系渐远,这 4 种鳗鲡聚为一类。

3 讨论

本文选取我国现有的养殖品种欧洲鳗鲡、日本鳗鲡、美洲鳗鲡、花鳗鲡以及新引进品种莫桑比克鳗鲡和西里伯斯鳗鲡的玻璃苗为材料,运用

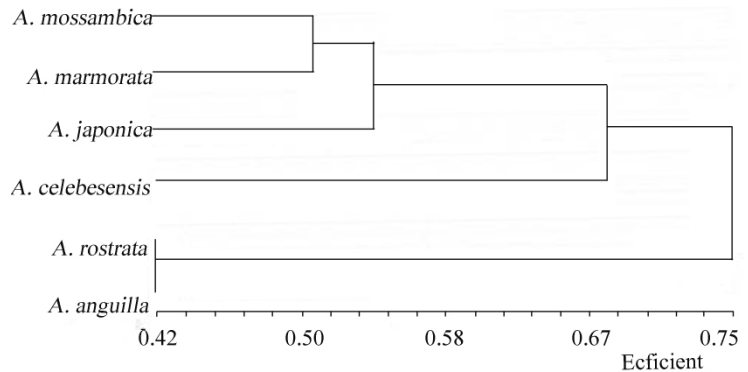


图 5 6 种鳗鲡聚类分析图谱

Fig. 5 Culster relationship of 6 populations in eel by UPGMA method based on Nei's genetic distance

RAPD 技术,筛选出能简便、快速鉴别 6 个鳗鲡品种的种间特异性片段引物。从 6 种鳗鲡的指纹图谱可以看出,不同的引物、不同的模板都能表现出不同的特异性图谱,并且有各自的特征性。经对品种扩增引物和扩增带数的综合分析,品种间在不同引物下的扩增产物、扩增带数以及扩增带的位点有很大差异,用于区分玻璃鳗品种是可行的。通过对这些指纹图谱的统计分析,可以获得大量的遗传进化资料,由于操作上的简化和快捷,因此,在遗传和进化研究分析方面,RAPD 技术具有很大的优势^[17]。Qiu 等^[10]应用 RAPD 技术对日本鳗、欧洲鳗和海鳗(*Muraenesox cinereus*) 基因组 DNA 进行分析比较,并筛选得到鉴别 3 种鳗鱼的分子标记;杨弘等^[9]对日本鳗、欧洲鳗和美洲鳗进行了种质鉴定;胡庚东等^[18]则对澳洲鳗、日本鳗和欧洲鳗做了初步的分析比较;研究结果显示了该技术的可靠性和便利性。

聚类分析显示欧洲鳗鲡与美洲鳗鲡亲缘关系最近,首先聚为一类;花鳗鲡与莫桑比克鳗鲡有较近的亲缘关系,日本鳗鲡与之也较接近,而西里伯斯鳗鲡关系稍远,这 4 种鳗鲡聚为一类。本结果说明鳗鲡亲缘关系与鳗鲡的地理分布密切相关,欧洲鳗鲡与美洲鳗鲡均分布于大西洋,其亲缘关系最近;花鳗鲡分布于南北半球的印度洋和太平洋,分布最为广泛,莫桑比克鳗鲡分布于南半球的印度洋,均属热带种类,其亲缘关系接近;日本鳗鲡分布于北半球的太平洋,西里伯斯鳗鲡分布于北半球的印度洋和南北半球的太平洋,遗传距离与上述品种均较大,亲缘关系较远。由此证实了这 6 种鳗鲡的遗传进化,除受地理分布关系外,还受洋流的影响。

利用 RAPD 分析中的一些种类特征性片段(图 1 - 图 4),协助玻璃鳗的形态特征鉴别品种,为玻璃鳗品种快速鉴定提供了重要手段,避免了形态相似品种的误判;另外,将所筛选引物对养殖的欧洲鳗鲡、美洲鳗鲡和日本鳗鲡盲检结果显示,引物能正确鉴定出品种。每个引物在每种鳗鲡中扩增的图谱均不相同,可称之为“RAPD 的指纹图谱”,这些特异的分子标记还可以转化为稳定的 SCAR 标记,将为鳗鲡的品种鉴别提供可靠依据,也可以为鳗鲡的人工繁育技术提供分子遗传背景支持。

参考文献:

- [1]Ege V. A revision of the genus *Anguilla* show a systematic, phylogenetic and geographical study [J]. Dana Report, 1939, 16 (3): 1 - 256.
- [2]松井魁. 鳗学(生物学研究篇) [M]. 东京: 恒星社厚生阁版, 1972: 4 - 75.
- [3]Castle P H J, Williamson G R. On the validity of the freshwater eel species *Anguilla ancestralis* ege from Celebes [J]. Coepeia, 1974(2): 569 - 570.
- [4]樊海平. 我国鳗鲡养殖业的现状与发展对策(上) [J]. 科学养鱼, 2006, 2: 1 - 2.
- [5]关景象, 樊海平. 欧洲鳗列入 CITES 附录 II 后对我国养鳗业的影响及对策建议 [J]. 中国水产, 2007, 10: 9 - 11.
- [6]樊海平. 鳗鲡产业的发展存在的问题及对策建议 [J]. 科学养鱼, 2008, 5: 3 - 5.
- [7]樊海平, 林煜, 钟全福, 等. 莫桑比克鳗鲡养殖生物学主要特性研究 [J]. 福建水产, 2008, 2(4): 7 - 12.
- [8]Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(22): 6531 - 6535.
- [9]杨弘, 王希道, 吴婷婷, 等. 用 RAPD 技术研究 3 种鳗鱼的种质鉴定 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 269 - 272.
- [10]Qiu J J, Yi P L. Random amplified polymorphic DNA analysis of eel genome [J]. Cell Research, 1999, 9(3): 217 - 223.
- [11]黄原. 分子系统学: 原理、方法及应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 186 - 193.
- [12]Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7(5): 478 - 484.
- [13]Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Nat Acad Sci, USA, 1979, 76(10): 5269 - 5273.
- [14]Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106(949): 283 - 292.
- [15]唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 249 - 267.
- [16]Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from as mall number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89 (3): 583 - 590.
- [17]Williams D J, Kazianis S, Walter R B. Use of random DNA(RAPD) for identification of largemouth bass amplified polymorphic subspecies and their intergrades [J]. Trans Am Fish Soc, 1998, 127(5): 825 - 832.
- [18]胡庚东, 尤洋, 陈家长. 澳洲鳗、日本鳗和欧洲鳗的 RAPD 初步比较分析 [J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2006, 25(3): 254 - 257.