

# 鲮、麦鲮和野鲮之 RAPD 的遗传标记

郑光明 张 跃 朱新平 罗建仁 夏仕玲

(珠江水产研究所,农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室,广州 510380)

**摘 要** 以野生和池塘养殖的64个鲮(*Cirrhina molitorella*)、10个麦鲮(*C. mrigola*)和10个野鲮(*Labeo rohita*)样本为材料进行了随机扩增多态性 DNA (RAPD)遗传分析。通过26个10bp随机引物扩增鲮、麦鲮和野鲮样品分别得到107、73、87个 DNA 片断,其多态位点百分率分别为35.5%, 39.7%, 37.9%。鲮与野鲮,麦鲮与野鲮及鲮与麦鲮的遗传距离分别为0.22, 0.58, 0.64。利用UPAMA 和 NJ 建立了3种鲮之间分子水平上的亲缘关系图,认为鲮与野鲮亲缘关系比麦鲮与野鲮和鲮与麦鲮更近,与同功酶相近,与传统分类不一致。

**关键词** 鲮,麦鲮,野鲮,随机扩增多态性 DNA,遗传标记

**中图分类号** S917, Q953

鲮(*Cirrhina molitorella*)和引进种麦瑞加拉鲮(*C. mrigola*)和露斯塔野鲮(*Labeo rohita*) (以下分别简称麦鲮和野鲮),现已成为我国南方主要池养鱼之一,其产量约占两广地区池塘鱼总产量的40%左右,具有产量高,抗病力强,肉质优美等特点,也是我国淡水鱼加工附加值最高的品种;但3种鱼抗寒力都差,而以麦鲮抗寒力较强,野鲮生长快,鲮肉质优美,至今它们的基础性研究偏少[吴力钊和王祖熊 1993,朱新平等 1992,1997]。近年来 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA,随机扩增多态性 DNA)技术已广泛用于遗传标记[Garcia 等 1996]、基因制图[Postethwait 等 1994]、遗传多样性[兰宏等 1996]物种亲缘关系和起源。进化及分类等诸方面的研究[惠东威等 1996, Hi Lu 1995]。为了科学地探讨3种鲮在分子水平上系统演化的亲缘关系,为杂交育种、选择优良品种提供遗传水平上的依据,加强鲮种质鉴定和原种保护,增强抗寒力,防止基因污染,很有必要从遗传角度研究这3种鱼的遗传变异特点。为此我们对珠江流域各地野生和池塘养殖的鲮、麦鲮和野鲮进行了 RAPD 遗传分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 基因组 DNA 提取

以野生和养殖鲮、麦鲮和野鲮为材料,在珠江流域的东江、西江和北江及本所良种基地随机取样,通过活鱼取血,参照[金冬雁和黎孟枫 1996]方法提取血液基因组 DNA,通过紫外光透射检测仪检测 DNA 含量及纯度,将 DNA 浓度稀释为10ng/μl,置4℃冰箱保存备用。

## 1.2 引物和试剂

所用引物为 Operon 公司的 OPN、OPM 两组引物,每一随机引物为10bp 的寡聚核苷酸; Taq DNA 聚合酶, $\lambda$ DNA/EcoR I、 $\lambda$ DNA/EcoRI+Hind III、PCRMarker 等分别购自上海 Sangon 公司和华美生物工程公司。

## 1.3 PCR 反应条件

参照 Williams 等[1991]提供的 RAPD 反应条件稍作改动。反应总体积为25 $\mu$ L,其中含1 倍的扩增缓冲液,3.0mM MgCl<sub>2</sub>,0.2mM dNTPs,0.2 $\mu$ M 随机引物,1.5 $\mu$ TaqDNA 聚合酶,20ng 模板 DNA。PCR 反应程序为:加上上述各样,其中反应混合物中 TaqDNA 聚合酶最后加入,轻轻混匀后于 PE2400 型 DNA 扩增仪上进行扩增:94 $^{\circ}$ C 预变性5分钟,94 $^{\circ}$ C 变性5秒钟,36 $^{\circ}$ C 退火30秒,72 $^{\circ}$ C 延伸50秒,共37循环,于72 $^{\circ}$ C 下延伸5分钟,置于4 $^{\circ}$ C 保存。取12 $\mu$ l 扩增产物在含有0.5 $\mu$ g/mL 溴化乙锭的1.4%琼脂糖凝胶上电泳,电泳缓冲液为1 $\times$ TBE,恒压100V 电泳45分钟,于紫外光透射检测仪上观察照相记录。

## 1.4 数据处理

(1) DNA 片断大小的计算:根据 DNA 在电场中的迁移率(d)与分子量(M)的对数成正比; $d=k\log M$ 。以  $\lambda$ DNA/EcoRI+Hind III 作为分子量大小标记,作图计算各扩增片断大小。

(2) 显现频率的计算:扩增的 DNA 片断出现次数占所扩增样本数的比率。

(3) 遗传距离(GD):任意两个物种的遗传距离(GD)根据 Nei 和 Li[1979]的公式来计算  $GD=1-S_{XY}$ ,  $S_{XY}=2N_{XY}/(N_X+N_Y)$ ,GD 是遗传距离, $S_{XY}$ 为 X 和 Y 物种 RAPD 标记的共享度, $N_X$  和  $N_Y$  分别为第 X 和 Y 物种拥有的 RAPD 标记数, $N_{XY}$ 是 x,y 两个物种共享 RAPD 标记数。

根据遗传距离用 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)和 NJ (neighbor-joining)[Saitou 和 Nei 1987]方法构建关系图。

# 2 结果

## 2.1 DNA 扩增结果

本研究利用 Operon 公司的 N,和 M 组中30个引物对基因组 DNA 扫描,选取了其中26个扩增效果好的引物进一步分析,实验中扩增的 RAPD 标记或位点为1~9,每个引物平均扩增 4.12个标记(表1),其中鲮、麦鲮和野鲮扩增片断分别为107、73、87,其多态位点百分率分别为 35.5%,39.7%,37.9%,图1列举了 OPN-6,OPN-9,OPM-8,OPM-10对三种鲮鱼的扩增结果。

## 2.2 DNA 扩增片断大小分布

通过计算扩增片断大小,发现其片断大小在2300~200bp 之间,500bp 以下是根据标准曲线估算得到的。表2列举了3种鲮的多态片断大小与显现频率。

### 2.3 三种鲮种间遗传距离与亲缘关系的初步分析

根据 Nei 和 Li[1979]的公式计算得到鲮,麦鲮,野鲮的 RAPD 片断共享度和遗传距离(表 3)并进行 UPGMA 和 NJ 聚类分析,构建关系图,结果如下。

由表3和图2可知,鲮与野鲮遗传距离短于鲮与麦鲮、麦鲮与野鲮,具有较近的亲缘关系,与同功酶分析相近[朱新平等 1992],与形态分类结论不一致[潘炯华 1991]。

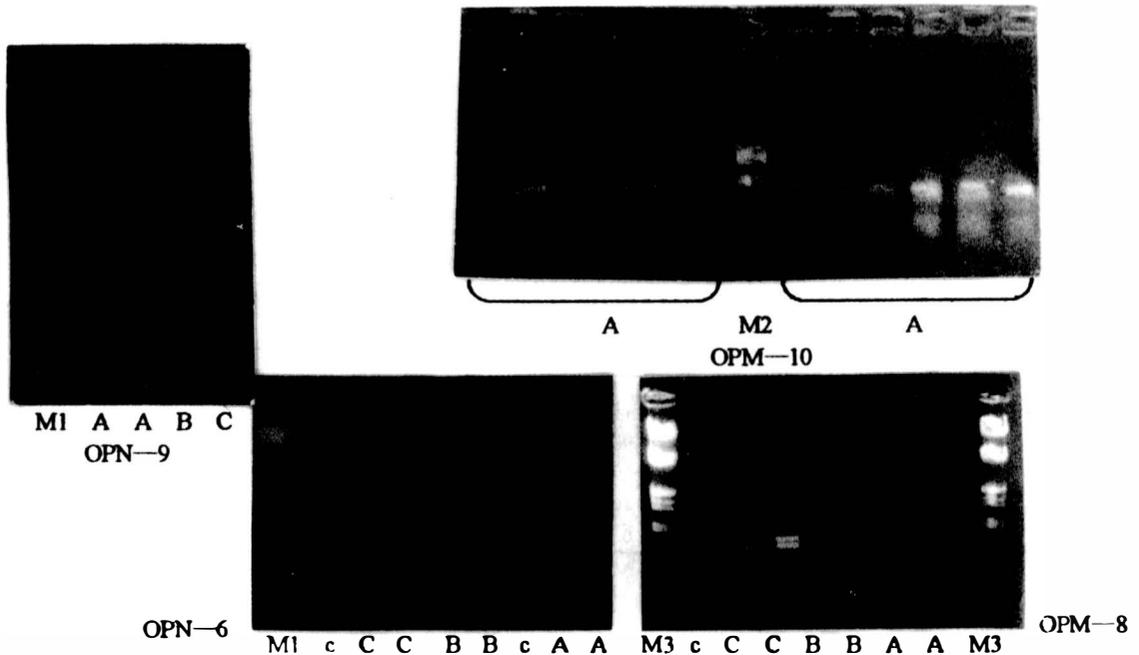


图1 OPN-6,OPN-9,OPM-8,OPM-10对鲮、麦鲮、野鲮的扩增结果

Fig. 1 The RAPD results of mud carp, India mrigal and India rohu amplified by OPN-6, OPN-9, OPM-8, OPM-10

图中 M1,M2,M3,A,B,C,c 分别为:λDNA/Hind III marker, PCR marker, λDNA/EcoRI+Hind III marker, 鲮,麦鲮,野鲮样本和对照。

表1 随机引物序列和扩增位点数

Tab. 1 Random oligonucleotide primer sequences and loci amplified (Operon Co.)

引物	5'~3'序列	扩增位点数	引物	5'~3'序列	扩增位点数
OPN-1	CTCACGTIGG	3	OPN-16	AAGCGACCTG	3~5
OPN-2	ACCAGGGGCA	1~5	OPN-17	CATTGGGGAG	1~5
OPN-3	GGTACTCCCC	3~5	OPN-18	GGTGAGGTCA	2~4
OPN-4	GACCGACCCA	2~4	OPN-19	GTCCGTACTG	2~3
OPN-5	ACTGAACGCC	5	OPN-20	GGTGCTCCGT	2~4
OPN-6	GAGACGCACG	1~6	OPM-6	CTGGGCAACT	3~4
OPN-7	CAGCCCAGAG	3~4	OPM-7	CCGTGACTCA	2
OPN-8	CAATCAGCTC	6~7	OPM-8	TCTGTTCCCC	2~3
OPN-9	TGCCGGCTIG	5~9	OPM-10	TCTGGCGCAC	2
OPN-10	ACAAGTGGGG	2~6	OPM-12	GGGACGTTGG	3
OPN-12	CACAGACACC	1~2	OPM-14	AGGGTCGTIC	2
OPN-13	AGCGTCACTC	3	OPM-16	GTAACCAGCC	3~4
OPN-14	TCGTGCGGGT	3	OPM-20	ACCTCTTGGG	1~5

表2 多态片段大小与显现频率

Tab. 2 The size and dominant frequency of polymorphic fragments

引物	片段大小(bps)	显现频率			引物	片段大小(bps)	显现频率		
		鲮	麦鲮	野鲮			鲮	麦鲮	野鲮
OPN-2	200	0.690	0	0.315	OPN-10	1080	0.102	0	0
OPN-2	650	0.265	0.106	0	OPN-16	200	0.617	0	0
OPN-2	1350	0.409	0.412	0.338	OPN-16	550	0.654	0.214	0.12
OPN-2	1900	0.641	0	0.543	OPN-18	350	0.152	0	0.223
OPN-3	<sup>3</sup> 00	0.523	0.412	0.315	OPN-18	560	0.542	0	0.542
OPN-3	<sup>5</sup> 00	0.551	0.351	0.551	OPN-18	860	0.049	0	0
OPN-4	960	0.219	0.219	0.223	OPN-19	800	0.318	0.121	0.110
OPN-4	1900	0.697	0	0	OPN-19	1200	0.390	0.155	0.330
OPN-6	500	0	0	0.878	OPN-19	1550	0.542	0.542	0.720
OPN-6	1300	0.665	0.505	0.500	OPN-19	2100	0.550	0.200	0.234
OPN-6	2100	0.098	0.500	0.500	OPM-6	1400	0.852	0.120	0.230
OPN-6	2300	0.500	0	0	OPM-8	800	0.500	0.201	0.300
OPN-7	<sup>8</sup> 00	0.375	0.518	0.413	OPM-8	1400	0.852	0.120	0.230
OPN-8	1200	0.216	0.127	0.223	OPM-8	2100	0.500	0.200	0.213
OPN-9	<sup>2</sup> 00	0.412	0.312	0.408	OPM-11	2100	0	0.500	0.300
OPN-9	400	0.223	0.312	0.213	OPM-16	1060	0.031	0.115	0.032
OPN-9	620	0.042	0.013	0.023	OPM-20	380	0.042	0.104	0.105
OPN-9	830	0.164	0.104	0.106	OPM-20	560	0.034	0.03	0.020
OPN-9	1370	0.274	0.137	0.107	OPM-20	1160	0.042	0.010	0.004
OPN-9	1500	0.102	0	0	OPM-20	1280	0.044	0.055	0

表3 鲮、麦鲮和野鲮的共享度和遗传距离

Tab. 3 The proportion of fragments shared and genetic distance among mud carp, India mrigal and India rohu

物种	鲮	麦鲮
麦鲮	0.42/0.58	
野鲮	0.78/0.22	0.36/0.64

注:本表中/左右数据为共享度/遗传距离。

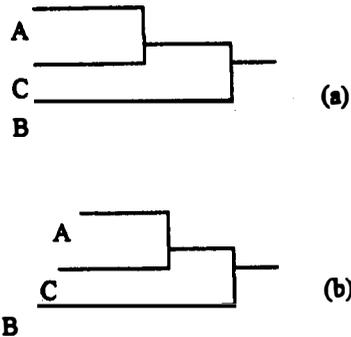


图2 鲮(A)、麦鲮(B)和野鲮(C)UPGMA(a)和NJ(b)聚类关系图

Fig. 2 The dendrogram based UPGMA(a) and NJ(b) of mud carp(A), India mrigal(B) and India rohu(C)

### 3 讨论

#### 3.1 取材和实验方法

采用非损伤性取鱼血提取基因组DNA分析,可保存实验鱼的活力,尤为适用于转基因鲮、染色体操作鲮、杂交鲮和其它濒危珍稀动物等的分析处理。本研究中PCR中94℃变性5秒

[Yu 和 pauls 1992],降低 Taq 酶消耗,节约时间,提高仪器使用效率,可用于鱼类 DNA 水平上的快速鉴定。

### 3.2 亲缘关系的分析

本实验认为鲮与野鲮遗传距离短于鲮与麦鲮、麦鲮与野鲮,具有较近的亲缘关系,与同工酶分析相近[朱新平等 1992],而潘炯华[1991]关于其分类是鲮和麦鲮同属鲮属,野鲮属野鲮属,产生这一差异可能与麦鲮和野鲮的样本数较少,有待进一步增加样本数进行分析;另一方面可能是由于环境的改变导致引入种遗传多样性的改变,特别是两引入种基本上是池塘养殖的,而鲮样本多数为野生,因而也会产生这种不一致的情况。

### 3.3 遗传多样性大小的分析

实验显示3种鲮的多态性偏小,多态位点百分率最高为麦鲮才39.7%。而虾最高在居群中多态百分率达77%[Garcia 等 1996],也就是说3种鲮遗传多样性偏小,这可能是物种对环境适应力将较差(不耐寒),具有相对保守性,另外在珠江流域,各地互相引种,各个江段也进行种苗放流,使原始种群受到养殖种群的杂交,遗传渐渗作用而丢失遗传多样性;也由于近年来3种鲮作为鳙等名贵鱼的饲料鱼而丢失遗传多样性。

### 3.4 在混合渔业和引种驯化管理中的作用

混合渔业管理在遗传上主要依靠蛋白质电泳对渔获物中不同来源种群的研究以确定合理的捕捞方案,以免微弱种群衰退或灭绝[Møller 1967],近年来, DNA 之 RFPLs 和 DNA 指纹也应用于混合渔业管理[Hallerman 和 Beckman 1988]。通过本研究可以推断 RAPD 技术也适应于混合渔业和引种驯化管理,包括本地种和引进种的鉴定。在实验中发现野生鱼类中以鲮占绝大多数而引进种麦鲮和野鲮很少(可能是养殖群体流放的原因),虽然三者具有一定的遗传共享度目前暂且不会发生遗传污染,但应加强野生鲮保护,寻找更多的原始种,建立鲮基因库,保护鲮遗传资源,而引进种麦鲮和野鲮应以池塘养殖为主,同时利用种间杂交提高鱼类的抗寒性能,利用 RAPD 分析可以积累有关遗传背景数据,从而把鲮的抗性改良与资源保护有机结合起来。

## 参 考 文 献

- 兰 宏,张文艳,王 文等. 1996. 滇金丝猴的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析. 中国科学(C), 26(3):244~249
- 朱新平,林礼堂,夏仕玲. 1992. 鲮鱼、麦瑞加拉鲮鱼及露斯塔野鲮酯酶同工酶的电泳分析. 淡水渔业, 5: 30~31
- 朱新平,夏仕玲,张 跃等. 1997. 转抗冻蛋白基因鲮鱼的初步研究. 中国水产科学, 4(2):79~80
- 吴力钊,王祖熊. 1993. 鲮鱼和二代混精鲮鱼低温时耐受能力的差异. 水生生物学报, 17 (3):206~210
- 金冬雁,黎孟枫译. 1996. 分子克隆实验指南(第二版). 科学出版社. 464~467
- 惠东威,庄炳昌,陈受宜. 1996. RAPD 重建的大豆属植物的亲缘关系. 遗传学报, 23(6):460~468
- 潘炯华(主编). 1991. 广东淡水鱼类志. 广东科技出版社. 174~175
- Garcia D K, Dhar A K, Alcivar-warren A. 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and different mRNA expression in *Penaeus vannamei*. Mol Mar Bio & Biotech. 5(1):71~83
- Hallerman E M, Beckman J S. 1988. DNA-levler polymorphism as a tool in fisheries science. Can J Fish Aquat Sci, 45:645~654
- Hi Lu K W. 1995. Evolution of finger millet. Evidence from random amplified polymorphic DNA. Gen. 38(2):232~238
- Møller D. 1967. Red blood cell antigens in cod. Sarsia, 29:413~430

- Nei M, Li W M. 1979. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonuclease. *Proceeding of the national Academy of Sciences*, 76(5):269~273
- Postiethwait J H, Johanson S H, Midson C W, et al. 1994. A Genetic linkage map for the zebrafish. *Sci.* 264(29):699~703
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method; a new method for restriction phylogenetic tree. *Mol Bio & Evol*, 4: 406~425
- Williams J G K, Hanafe M K, Rafalski J A, et al. 1991. Genetic analysis with RAPD markers. *Methods in Enzymology. Recombinant DNA volume*; 2~17
- Yu K, Pauls K P. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl Acids Res*, 20(10):2606

## THE GENETIC MARKERS OF *CIRRHINA MOLITORELLA*, *C. MRIGOLA* AND *LABEO ROHIT* FROM RAPD

ZHENG Guang-Ming, ZHANG Yue, ZHU Xin-Ping, LUO Jian-Ren, XIA Shi-Ling  
(Key Laboratory of Tropical & Suptropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture,  
Pearl River Fisheries Research Institute, Guangzhou 510380)

**ABSTRACT** The genetic assessment of 64 wild and cultivated mud carp, *Cirrhina molitorella*, 10 India mrigal, *C. mrigola* and 10 India rohu, *Label rohita* is inferred from its RAPD analysis. 107, 73, 87 DNA fragments in mud carp, India mrigal and India rohu are amplified respectively by 26 10bp-primers. The polymorphic loci percentage is 35.5%, 39.7%, 37.9% respectively. The genetic distance of mud carp-India rohu, mud carp-India mrigal and India mrigal-India rohu is 0.22, 0.58, 0.64 respectively. The relationship of mud carp-India rohu is more close than mud carp-India mrigal and India mrigal-India rohu by the dendrogram of the three species based on UPGMA and NJ. This is similar to allozyme analysis, but there is differential from traditional taxonomy.

**KEYWORDS** *Cirrhina molitorella*, *Cirrhina mrigola*, *Labeo rohita*, RAPD, genetic marker

### 欢迎订阅2000年《海洋与湖沼》

《海洋与湖沼》是由中国海洋湖沼学会主办的全国性学术期刊,于1957年创刊,系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物,以报道基础研究、应用基础研究论文为主,同时重视应用研究、开发研究成果的发表;论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣、综述、学术简讯、科学简介、书评等栏目。

据中国科学引文数据库所公布资料,在国内科技期刊引文频次最高的500名排行榜中,本刊1996年列第35名,1997年列第31名,均为本学科领域首位。国际上有SCI、CA、SA、JICS、PJK等五大检索系统引文收录本刊。1998~1996年获省部级以上优秀科技期刊奖8项,最高为国家二等奖。

本刊为双月刊,每期112页,单月出版,国内外公开发行。每期定价12元,全年72元(含邮费)。国内统一刊号:CN37-1149/P,国外发行代号:BM69,国内邮发代号:2-421。全国各地邮局办理订阅手续,如漏订或补订当年和过期期刊,请直接向本刊编辑部订阅,地址:青岛市海路7号,邮政编码:266071;联系电话:0532-2879062-2528;E-mail:bsun@ms.qdio.ac.cn。