

文章编号: 1004-7271(2001)03-0207-06

应用 RAPD 技术分析三种红鲤遗传多样性

孙景春, 楼允东, 姚纪花

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要:利用 40 个随机引物对产于江西省的荷包红鲤、玻璃红鲤和兴国红鲤及野鲤(俗称“江西三红”)进行了 RAPD 检测及聚类分析。结果表明, 25 个引物的扩增效果良好, 引物 S225、S221 对 4 种鲤鱼扩增出的指纹图谱差异显著, 存在 5 个明显的特异性条带, 可作为分子标记; 三个品种内, 以荷包红鲤的遗传距离最小(0.809); 对于品种间, 则是玻璃红鲤与兴国红鲤较为相似(0.745), “江西三红”之间的遗传差异较小; 根据聚类分析可知兴国红鲤与玻璃红鲤之间的亲缘关系最近, 荷包红鲤次之。

关键词:荷包红鲤; 兴国红鲤; 玻璃红鲤; 野鲤; 随机扩增多态 DNA

中图分类号: Q953+.3 **文献标识码:** A

Application of RAPD technology to analyze the genetic diversity of three breeds of red carp

SUN Jing-chun, LOU Yun-dong, YA○ Ji-hua

(Fisheries College, SFU, Shanghai 200090, China)

Abstract: The three breeds of red carp in Jiangxi Province, namely *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis* in Wuyuan County, *Cyprinus carpio* var. *xingguonensis* in Xinguo County, and *Cyprinus carpio* var. *wananensis* in Wanan County are important cultivation breeds in China. In this paper, random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used for molecular biology analysis of genetic diversity among these three red carps for the first time. Forty random primers were used for the analysis of nuclear DNA polymorphism of the three breeds of red carp in Jiangxi Province and wild carp. A clustering analysis was made based on RAPD results with UPGMA and NJ methods in PHYLIP software package (version 3.5) and the phylogenetic trees were constructed. The results show that the intra-breed genetic similarity of *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis* is the highest (0.809) and the heterozygosity is the lowest, while the genetic similarity between *Cyprinus carpio* var. *xingguonensis* and *Cyprinus carpio* var. *wananensis* is the highest (0.745), indicating their genetic relationship is closer.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*; *Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*; *Cyprinus carpio* var. *wananensis*; wild carp; RAPD

原产于江西省婺源县的荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*)、万安县的玻璃红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*)和兴国县的兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*)(俗称“江西三红”)是我国的重要养殖品种, 具有生长快、繁殖力强、食性广和适应性强等优点, 经济价值较高, 既可食用, 又有观赏价值。同时, 它们还是重要的杂交亲本, 杂交亲和力强, 容易与其它鲤杂交, 杂种的优势明显, 如丰鲤(兴

国红鲤♀×散鳞镜鲤♂)、荷元鲤(荷包红鲤♀×元江鲤♂)、芙蓉鲤(散鳞镜鲤♀×兴国红鲤♂)、岳鲤(荷包红鲤♀×湘江野鲤♂)和异育银鲫(方正银鲫♀×兴国红鲤♂)等^[1]。

自20世纪70年代以来,对“江西三红”的生物学性状和生长性能以及细胞遗传学与生化遗传学等进行了较多研究^[2-6],但分子遗传学方面的研究报告尚不多见^[7]。本文应用RAPD方法对“江西三红”及野鲤进行遗传距离的检测,并分析其亲缘关系,以期为我国鲤鱼遗传育种提供分子生物学方面的资料。

1 材料与方法

1.1 材料

兴国红鲤采自江西省兴国红鲤原种场,荷包红鲤采自江西省婺源县荷包红鲤原种场,玻璃红鲤采自江西省万安县鱼种场,野鲤采自江西省南昌县莲塘赣江支流河浜。每群体12尾,取肌肉组织,提取总DNA,进行RAPD分析。

1.2 方法

1.2.1 总DNA的提取

取0.1g背部肌肉,切碎,加入500μL裂解缓冲液(315 μL ddH₂O,50μL 10% SDS,100μL EDTA,25μL 0.5mol/L Tris),最后加入蛋白酶K,使其终浓度为20mg/mL。充分混匀,放到摇床上,37℃摇18h。加入等体积的饱和酚,摇匀,13 000r/min,离心20min;取上清液加入1/2体积的酚与1/2体积的氯仿:异戊醇(24:1),混匀,13 000r/min离心5min;取上清液加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),混匀,13 000r/min离心5min,取上清液加入2倍体积的预冷的纯乙醇,-20℃过夜。真空抽干,加入TE(pH 8.0)200μL溶解,电泳检测。保存于4℃备用。

1.2.2 PCR扩增

反应在日本ASTECC公司生产的PC-701PCR循环仪上进行,反应混合液组成为:10mmol/L Tris-HCl pH 9.0,50mmol/L KCl,2.0mmol/L MgCl₂,0.001%明胶,0.1mmol/L 每种dNTP,0.2 μmol/L引物(随机引物S221-240、S421-440购自上海生工生物工程技术有限公司),25 ng基因组DNA,1U Taq DNA聚合酶(购自加拿大BioStar公司),反应体积为25μL。扩增条件为:94℃预变性2min;然后94℃变性30s,36℃退火30s,72℃延伸1.5min,35个循环;再于72℃下延伸5min。

扩增产物在1.5%的进口琼脂糖凝胶中(含适量EB)电泳,电泳缓冲液为1×TBE,电压5V/cm,电泳2.0h后,置于紫外灯下观察拍照、记录。

1.2.3 数据处理

两个体间的遗传相似性指数按公式 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 来计算, N_x 和 N_y 分别是个体X、Y的扩增带数, N_{xy} 是X、Y个体间的共享带数。群体内的相似性指数(S)是种群内所有的两个体间相似性指数的平均值。群体间的遗传相似性指数 S_{ij} 为群体*i*中的个体和群体*j*中的个体随机组合所得相似性指数的平均值。统计时仅记录清晰稳定的扩增条带。

1.2.4 聚类分析

距离法(distance methods)分析采用PHYLIP 3.5C版本软件包中的“UPGMA”和“NJ”程序进行聚类。

2 结果

2.1 RAPD的扩增结果

在所使用的40个引物中,其中25个引物的扩增效果良好,单一引物扩增的条带数由2~13条不等(表1),扩增片段长度大多在300~3 000 bp。25个引物共产生2 575条带,其中荷包红鲤、玻璃红鲤、兴国红鲤及野鲤的DNA标记数分别为650、633、647和645个,62条带为4种鲤鱼所共有,5条带具有群体

或个体特异性,显示了丰富的多态性,但个体和群体间的差异性较低。25个引物中,S221和S225等扩增的4种鲤鱼的DNA指纹图谱差异非常明显(图1)。图1表明,在引物S225的扩增产物中,荷包红鲤有900bp左右的特异片段,野鲤和兴国红鲤有~700bp左右的特异片段,兴国红鲤有~500bp左右的特异片段,荷包红鲤、野鲤和兴国红鲤有~特异片段,长度为1700bp;在S221的扩增产物中,兴国红鲤有~特异片段,长度分别为800bp左右(图2)。这5个片段都具有种群的特异性,因此可作为鉴定这4种鲤的分子标记。

表1 25个引物的DNA序列及其扩增效果

Tab.1 Sequences of 25 primers and their amplified results

引物	序列	扩增条带数	扩增条带总数	共有条带数	特异条带数
S221	TCACGCATGG	2~8	86	1	1
S223	CTCCCTGCAA	5~10	128	6	0
S224	CCCCTCACGA	3~10	89	2	0
S225	TCCGAGAGGG	9~12	240	6	4
S229	TGTACCCGTC	4~8	88	1	0
S232	ACCCCCACT	5~12	148	3	0
S233	ACCCCCGAA	5~11	136	4	0
S234	AGATCCCGCC	4~13	120	2	0
S235	CAGTCGGGT	5~12	146	2	0
S236	ACACCCACACA	5~10	117	1	0
S237	CCGCCTTCTA	5~10	111	4	0
S238	TGGTGGCGTT	2~7	72	2	0
S401	TGCCTGGCGTT	2~7	51	0	0
S402	ACAACGCCCTC	5~13	146	2	0
S402	GGGGGATGAC	4~10	121	2	0
S404	GGCGCTTCTC	4~10	111	3	0
S405	GGAAACCTGT	2~5	55	2	0
S407	CCGTGACTCA	6~11	131	4	0
S408	TCTGTTCGCC	5~8	109	4	0
S413	GTCGTCAAG	2~6	68	1	0
S414	AGGGTCCGTC	3~7	70	1	0
S415	GACCTACCAC	3~9	91	3	0
S416	GTAACCAGGC	4~7	80	2	0
S416	CACCATCCGT	3~5	68	3	0
S420	AGGTCTTGGG	3~6	64	1	0
合计			2575	62	5

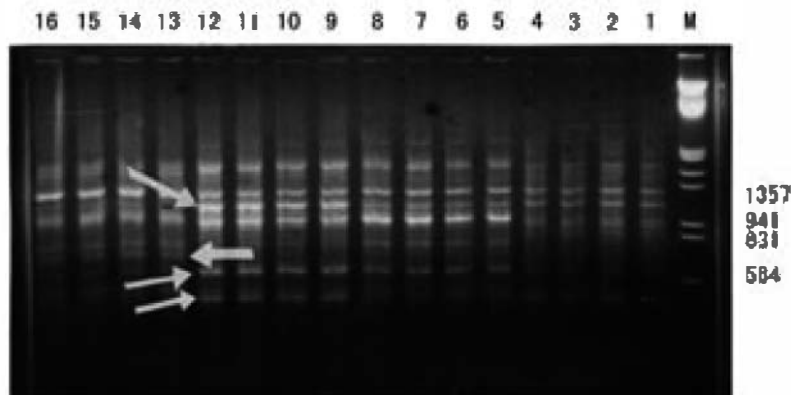


图1 4种鲤用引物S225扩增的RAPD结果(箭头示特异带)

Fig.1 The RAPD results of four breeds of red carps produced by primer S225

(Arrows showing population-specific bands)

M:λDNA/HindIII + EcoRI; 1~4:玻璃红鲤;5~8:野鲤;9~12:兴国红鲤;13~16:荷包红鲤。

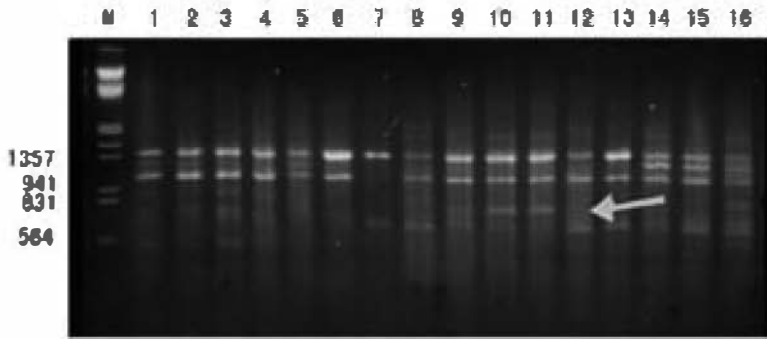


图2 4种鲤用引物 S221 扩增的 RAPD 结果(箭头示特异带)
Fig.2 The RAPD results of four kinds of red carps produced by primer S221
(Arrow showing population-specific bands)

M:ADNA/HindIII + EcoRI; 1~4:玻璃红鲤;5~8:野鲤;9~12:兴国红鲤;13~16:荷包红鲤。

2.2 群体内和群体间的相似性指数

从表2可以看出:4种鲤中,以荷包红鲤的遗传距离最小(0.809),野鲤其次(0.839),而兴国红鲤的遗传距离最大(0.872);对于种群间,则是玻璃红鲤与兴国红鲤较为相似(0.745),玻璃红鲤与野鲤次之(0.713),兴国红鲤与野鲤差异较大(0.689)。“三红”之间的差异不是很大。

表2 四种鲤种群内和种群间的相似性指数

Tab.2 Inter-and intrapopulation genetic similarity index of 4 breeds of carps

品种名称	野鲤	玻璃红鲤	兴国红鲤	荷包红鲤
野鲤	0.839	0.713	0.689	0.702
玻璃红鲤	-	0.862	0.745	0.696
兴国红鲤	-	-	0.872	0.711
荷包红鲤	-	-	-	0.809

2.3 聚类分析

应用 UPGMA 和 NJ 两种方法进行聚类分析,结果见图3和图4。

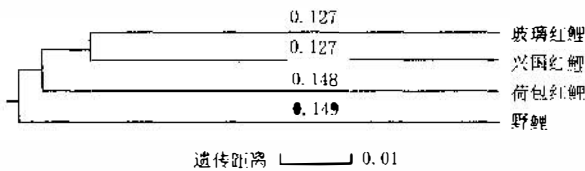


图3 UPGMA法建立的4种鲤的亲缘关系(遗传距离 $S = 1 - 1/F$, F为25个引物计算的平均同源性值)

Fig.3 The constructed phylogenic dendrogram of 4 breeds of carp by UPGMA (Genetic distance $S = 1 - 1/F$, F: Average value based on 25 primers)

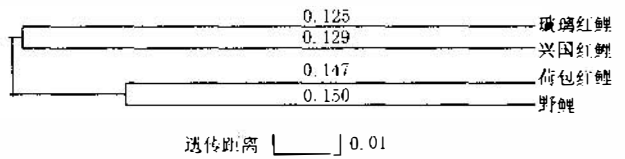


图4 NJ法建立的四种鲤的亲缘关系(遗传距离 $S = 1 - 1/F$, F为25个引物计算的平均同源性值)

Fig.4 The constructed phylogenic dendrogram of 4 breeds of carps by NJ (Genetic distance $S = 1 - 1/F$, F: Average value based on 25 primers)

从这两种方法均可看出,兴国红鲤与玻璃红鲤之间的亲缘关系最近,荷包红鲤次之。

3 讨论

3.1 RAPD 技术

RAPD 技术具有快速、简便、通用性好、对 DNA 需求量小和质量要求低等优点,因此已经成功地运用于许多领域的研究。但 RAPD 标记存在显性标记、重复性低以及共迁移的 RAPD 标记是否具有同源性等问题。正是由于这些问题的存在,使许多研究者对该技术的应用产生疑问,下面就几个普遍存在的问题进行讨论,以期找到可行的解决方法,使 RAPD 技术更趋完善。(1)关于 RAPD 的重复性。影响 RAPD 产物重复性的因素很多,如模板的质量和纯度、引物的质量和长度、dNTP 的浓度、Taq 酶的批号、 Mg^{2+} 的

浓度、反应时间与温度参数、技术设备以及数据的处理方法等,均可影响 RAPD 在研究中的效果。因此,为了使 RAPD 结果具有稳定的重复性,使各个实验室的实验结果具有可比性,应建立一个最佳的标准化参数表。本研究所采用的试剂及实验方法是参考了邹曙明等^[8]的方法的基础上稍加改进所完成的,实验的重复性较好,与 Wang 等^[1]的研究结果相一致。由此可以说明 RAPD 技术在规范实验试剂、步骤等因素的基础上是具有可比性的,其重复性是可以控制的。在鱼类研究中,就 RAPD 技术方法论的研究也有所报道。Corley-Smith 等^[9]报道了应用荧光染色法来分析 RAPD 片段比用 EB 染色更准确、更详细。Bielawski 等^[10]分析了 RAPD 产生各种条带的原因,并对 RAPD 最适条件进行了研究。但建立标准化参数表还需大量的研究。(2)关于引物的种类和数目的选择。目前用于 RAPD 研究的引物数目依不同的实验室而有所不同,那么到底多少为最合适呢?数目太少,结论不可靠;数目太大,费用增高。周泽扬等^[11]就此问题在桑蚕和桑属植物中进行了研究,结果表明,在用 RAPD 进行生物系统学研究中,以分析 70 个左右位点数为宜。鱼类 RAPD 位点数多少为合适,还有待探索。本研究引物的筛选是参考了邹曙明等^[8]和姚纪花和楼允东^[12]所报道的文献,这两篇文献所研究的对象均为鲤科鱼类,与本实验的研究对象具有较近的同源性。因此,在他们研究的基础之上,选择了 S221 - 240 和 S421 - 440 这两组引物。

3.2 品种内的差异

我们采用 RAPD 方法对 3 种鲤鱼品种内及品种间的遗传差异进行研究,结果显示,在品种内部,兴国红鲤个体间的遗传相似数较大(0.872),玻璃红鲤次之,荷包红鲤最低,也就是说兴国红鲤个体间的差异较小,纯度较高;而荷包红鲤个体间的差异最大,则纯度最低。因此,对于种质资源的保护来讲,对亲本还应进行进一步的提纯复壮以及防止不同品种之间的混杂,后面一点对于目前尤为重要。为了适应经济的发展,我国从国外及国内不同地区之间引种非常常见,但在引种的同时,不应忽视对种质资源的保护。

3.3 品种间的差异

对于品种间,以 UPGMA 和 NJ 两种方法进行聚类分析均表明,玻璃红鲤和兴国红鲤亲缘关系最近,其次是荷包红鲤,最后是野鲤。从形态上来看,“江西三红”的体色均为橘红色或橘黄色,除了体色相同外,它们均有各自特殊的形态标志,荷包红鲤的体型特别粗短,显得背高腹圆,形似荷包;兴国红鲤和玻璃红鲤均为长体型,其差别仅为玻璃红鲤的鱼体透明;而荷包红鲤与前两者的体形差别较大。该实验的结果与形态学上归类基本一致。“江西三红”之间的差异较小,结果如表 2 所示,表明三者之间的分化时间不长。但三者与野鲤的遗传相似系数分别为 0.713、0.689、0.702,即遗传距离较大,为杂交育种中亲本的选择提供了一定的数据资料。

3.4 野鲤的遗传多样性的探讨

本实验的结果表明,野鲤的不同个体间的遗传相似性较高(0.839),也就是说,不同个体间的遗传多态性较低。由此说明,野生鲤品种内的纯度较高,变异性较小。这一结果可从两个方面进行说明,一个是野生鲤鱼品种的确比较纯,在自然界中受到其他品种的遗传渐渗较低;另一方面,也可能是由于地理环境的隔绝,该地区的野生鲤与其他地区的鲤品种的遗传物质的交换少。

3.5 展望

传统的杂交亲本纯度的选择通常是应用传统的侧交和后裔鉴定等方法检测,周期长,偏差大,而分子生物学标记可以辅助品种纯度的检测,加快选择速度。但是,纯度标准还有待于进一步探讨研究。

尽管目前 RAPD 技术存在这样那样的问题,但是随着科学技术的发展,会逐步得到改进和完善。RAPD 技术作为新一代的分子标记技术,由于它的快速、简便、通用性好以及对 DNA 需求量小和安全要求低等优点所决定,势必会成为分子遗传学、育种学、分类学和生物进化研究中的强有力的工具,应用前

(1) Wang Cheng-hui, Li Si-fa, Zou Shu-ming. 2000. Genetic Diversity Study on Red Common Carps in China by RAPD. The Third World Fisheries Congress Abstracts Book, 377.

景十分广阔。

在采样过程中,得到江西省吉安地区农业局水产站、上饶地区农业局水产站、赣州市农业局水产站、婺源县荷包红鲤原种场、兴国红鲤原种场、万安县鱼种场以及南昌县莲塘水产试验中心领导与职工的大力支持与热情接待;另外,渔业学院周志刚博士为本试验提供 PCR 仪,张敏老师协助拍摄电泳照片。在此一并表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1999. 67-83,345.
- [2] 邓宗觉. 江西婺源荷包红鲤体型形成及体色遗传的探讨[J]. 淡水渔业,1981,6:14,22.
- [3] 蒋一柱,张德蜀,朱居宏,等. 荷包红鲤与野鲤的某些生物学特性比较[J]. 水生生物学集刊,1963,3:82-92.
- [4] 薛耀环. 选育前后兴国红鲤的生长对比试验[J]. 淡水渔业,1988,6:26-27.
- [5] 江西大学生物系,江西婺源荷包红鲤研究所. 荷包红鲤的生物学[J]. 江西大学学报(自然科学版),1983,(4):19-36.
- [6] 江西大学生物系,万安县鱼种场. 万安玻璃红鲤生物学性状调查报告[J]. 江西大学学报(自然科学版),1977,(2):18-35.
- [7] 张建森,孙小异,施永红,等. 江西省鲤生物遗传多样性调查和 DNA 指纹分析[J]. 中国水产科学,1997,4(5):8-14.
- [8] 邹曙明,楼允东,孙效文,等. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和 3 个地理种群鲤的亲缘关系[J]. 2000,中国水产科学,7(1):6-11.
- [9] Corley-Smith G E, Lim C J, Kalmar GB, et al. Efficient detection of DNA polymorphisms by fluorescent RAPD analysis [J]. Biotechnol, 1997, 22(4):690-692,694,696.
- [10] Bielawski J P, Nosck K, Purno D E. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA [J]. Biotechnol, 1995, 18(5):856-860.
- [11] 周泽扬,夏庆友,鲁成,等. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系[J]. 遗传,1998,20(5):12-15.
- [12] 姚纪花,楼允东. 三种群银鲫的 RAPD 分析初报[J]. 上海水产大学学报,2000,9(1):11-20.

欢迎订阅 2002 年《中国水产》

《中国水产》创刊于 1958 年,是农业部唯一一本国内外公开发行的渔业综合性月刊,发行量始终居同行业第一,系水产、渔业类核心期刊。《中国水产》内容丰富,通过《中国水产》,您可以更及时、准确地了解——我国渔业发展的方针政策;各地渔业信息和市场动态;海、淡水养殖技术,特别是名特优新品种养殖技术;加工、渔机、捕捞、资源的新技术新方法;休闲渔业的发展动态和相关技术等。《中国水产》已成为渔业界数十万读者的必备读物。

《中国水产》杂志是渔业界广告宣传效果最好的媒体之一,多年来,通过《中国水产》杂志的广告宣传,已使众多的商家得到了发展壮大。

《中国水产》杂志每月 15 日出版,16 开。2002 年每期定价为 5.00 元,全年 12 期为 60 元。您可通过当地邮局订阅本刊(邮发代号:2-136),也可直接汇款到中国水产杂志社订阅。

中国水产杂志社

地址:北京市朝阳区华威西里甲 48 号南楼

邮编:100021

电话:010-87781416

传真:010-87781417 87781415

电子信箱:magazine@ifishery.com