

草鱼和鲤群体遗传变异的 RAPD 指纹分析

章怀云 刘荣宗 张学文 陈 韬

肖调义 李晋衡

(湖南农业大学 长沙 410128)

摘要 利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对草鱼、兴国红鲤、野鲤的种群内、种群间以及种间的遗传变异进行了定量分析。结果表明: 草鱼与鲤的 RAPD 指纹图谱带型差异显著, 草鱼与红鲤和鲤种间的平均带纹相似系数 (ABS) 分别为 0.2583 和 0.2394, 遗传距离 (D_j) 分别达 0.9362 和 1.2277。而红鲤和鲤种群间的 RAPD 指纹图谱带型则基本一致, 平均带纹相似系数为 0.7162, 遗传距离只有 0.0947。草鱼、兴国红鲤、鲤种群内平均带纹相似系数分别为 0.8424、0.7819、0.7928, 平均带纹频率 (\bar{F}) 分别为 0.82、0.71 和 0.74, 相应的遗传变异度分别为 0.18、0.29 和 0.26。

关键词 随机扩增多态 DNA, 遗传标记, 遗传变异, 草鱼, 鲤

随机扩增多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 是九十年代初在聚合酶链反应 (PCR) 技术基础上发展起来的一项 DNA 多态性检测新技术^[1,2]。RAPD 分析采用任意引物的 (一般 9-10bp) PCR 反应 (AR-PCR) 从基因组中随机扩增多态性 DNA 片段。其主要优点是简便快捷, 一次可探测多个位点, 无需目标区的核苷酸序列信息。这一新型 DNA 分子标记近年来已被广泛应用于各种动植物的 DNA 多态性分析^[3-6], 并显示了极大的应用潜力。利用 RAPD 标记对草鱼和鲤的群体遗传变异进行了初步研究, 本文对研究结果作一报道。

1 材料与方法

1.1 取样群体 10 尾兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* var.) 分别来自湖南农业大学水产系实验渔场和长沙郊区 2 个生产渔场; 10 尾草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes) 和鲤 (*Cyprinus carpio* Linnaeus), 分别来自长沙市周围朗梨镇等 5 个集贸市场。

1.2 基因组 DNA 分离 取 -20℃ 下冻存的鲜肝组织约 100mg, 加入 DNA 提取裂解液 500μl, 制成匀浆。加入蛋白酶 K 至终浓度 400μg / ml, 50℃ 温育 3h。加一倍体积苯酚 / 氯仿重复抽提两次, 取上清液。再用 2 倍体积 100% 乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 最后悬浮于

TE(pH8.0)缓冲液中。

1.3 RAPD-PCR 条件 10-mer 随机引物 (C + G 为 60–70%) 分别购自美国 Opern 和 CyberSyn 生物工程公司。每 25 μ l PCR 反应液中含 Taq DNA 聚合酶 2U, 10 \times buffer 2.5 μ l, dNTP, 200 μ mol/L, MgCl₂ 2.5ml, 引物 33ng, DNA 模板 100ng。PCR 反应先在 94 $^{\circ}$ C 预变性 2.5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1.5min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 链延伸 2.5min, 进行 40 个循环, 再于 72 $^{\circ}$ C 后延伸 5min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙啶染色显带, 紫外灯下观察、拍照。

1.4 带纹相似系数 个体间带纹相似系数根据 Lynch^[7]的公式计算:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / N_x + N_y$$

式中: N_{xy} 是 RAPD 指纹图谱中个体 X 和 Y 的共有带纹数, N_x 和 N_y 分别为个体 X 和 Y 各自可分辨带纹总数。平均带纹相似系数 (ABS) 通过对群体内 (间) 各个体对子的带纹相似系数简单平均而求得。

1.5 平均带纹频率与遗传变异度 平均带纹频率 (\bar{F}) 的计算公式为:

$$\bar{F} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N F_i$$

遗传变异度根据 Kuhnlein 等的公式计算:

$$V = 1 - \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N F_i$$

式中: N 为种群内 RAPD 图谱可分辨带纹总数, F_i 为样本群体中第 i 条带纹的频率, 即带有第 i 条带纹的个体数占总个体数的比率。

1.6 遗传距离 种群间遗传距离按 Lynch^[8]的公式计算:

$$D_{ij} = -\ln [S_{ij} / \sqrt{S_i S_j}]$$

式中: S_{ij} 是两个群体 i 和 j 之间的平均带纹相似系数, S_i 和 S_j 分别为群体 i 和 j 的种群内平均带纹相似系数。

2 结果

2.1 草鱼和鲤 RAPD 指纹图谱特征

从总计 60 个随机引物中筛选出 7 个带纹较为清晰, 多态性较丰富的引物用于本试验分析。扩增产物分子量一般在 2.0kb 以下。其余引物有的无扩增产物, 有的带型过于复杂, 难以分辨, 有的则无多态性带纹。各种群平均每一引物所获得的带纹数为: 草鱼 4.28 ± 1.89 条, 红鲤 5.57 ± 2.44 条, 鲤 6.00 ± 4.12 条 (表 1)。从 RAPD 图谱带型来看, 草鱼比鲤带型较为整齐, 带纹数明显较少, 草鱼与鲤带型差异明显, 而红鲤和鲤带型相似 (图 1)。此外, 7 个引物共扩增出草鱼特异性带 17 条, 鲤特异性带 32 条。

草鱼和鲤 RAPD 指纹图谱带型的差异反映了这两种鱼类的遗传组成显著不同。此外, 带纹数目多寡则与种群遗传纯度有一定关系。Kuhnlein 等对具有不同近交水平的鸡品系进行 DNA 指纹分析发现, 当鸡群平均近交系数为 0.026 时, 不同带纹数为 25 条; 近交系数为 0.39 时, 不同带纹数为 13 条; 当近交系数上升至 0.98 以上时, 不同带纹数仅为 8 条^[9]。这主要

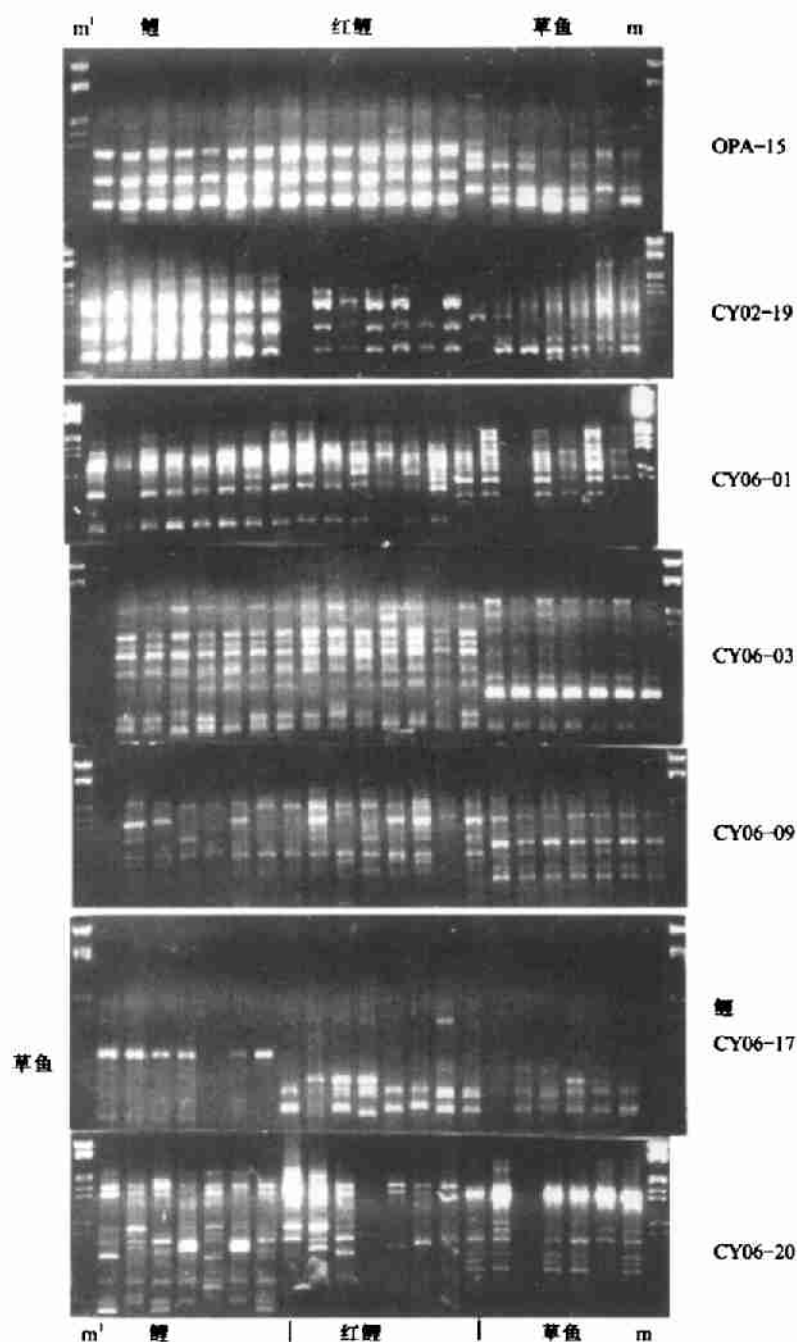


图1 草鱼和鲤的 RAPD 指纹图谱

Fig.1 RAPD fingerprints of grass carp and common carp

注: M 表示 DNA 分子量标记 (λ DNA / *Hind* III + *Eco* RI)

M denotes DNA molecular weight marker

是因为当近交水平和遗传纯度高时,各等位基因在一定程度上被固定,因而频率上升,数目减少。两种鱼类种群间特异性带纹的大量存在表明了它们之间存在极显著的遗传差异。

2.2 带纹频率与遗传变异度

草鱼、红鲤、鲤种群内平均带纹频率分别为 0.82、0.71 和 0.74(表 1),草鱼高于鲤,相应的遗传变异度则草鱼低于鲤(0.18、0.29 和 0.26)。这进一步证明草鱼的遗传纯度较鲤为高。

2.3 种群内和种群间带纹相似系数

统计了各种群 RAPD 图谱 21 对个体间的带纹相似系数,然后求出 ABS 值。草鱼、红

表1 草鱼和鲤RAPD指纹图谱特征

Tab.1 Characteristics of RAPD fingerprints of grass carp and common carp

引 物 Primer	特异性带纹 Specific bands		草 鱼 Grass carp		红 鲤 Red Common carp		鲤 Wild common carp	
	草 鱼	鲤	带纹数目	频 率	带纹数目	频 率	带纹数目	频 率
	Grass carp	Common carp	(N)	(Fi)	(N)	(Fi)	(N)	(Fi)
OPA-15	3	2	5	0.45±0.25	3	1.00±0.00	3	1.00±0.00
CY02-19	3	2	4	0.57±0.34	3	0.94±0.10	3	1.00±0.00
CY06-01	3	2	3	1.00±0.00	3	0.62±0.44	2	0.93±0.10
CY06-03	3	5	5	0.94±0.13	7	0.79±0.32	6	0.83±0.34
CY06-09	2	6	5	0.94±0.13	8	0.69±0.30	8	0.45±0.27
CY06-17	1	7	1	1.00±0.00	7	0.41±0.20	6	0.45±0.43
CY06-20	2	8	7	0.81±0.34	8	0.53±0.34	14	0.56±0.32
总平均 Total mean	2.42±1.79	4.5±2.57	4.28±1.89	0.82±0.22	5.57±2.44	0.71±0.21	6.00±4.12	0.74±0.25
遗传变异度 (V)				0.18		0.29		0.26

鲤、鲤 ABS 值分别为 0.8424 ± 0.056 、 0.7819 ± 0.082 、 0.7928 ± 0.066 。(表 2)。此外,分别统计了各种群间 RAPD 图谱 49 对个体间带纹相似系数,求得草鱼与红鲤和鲤种群间 ABS 值分别为 0.2583 ± 0.038 和 0.2394 ± 0.053 ,而红鲤与鲤种群间 ABS 值为 0.7162 ± 0.060 。ABS 主要反映种群内和种群间的各个体间平均遗传同源性(Genetic homogeneity)。从种群内 ABS 看,草鱼高于鲤,说明草鱼抽样群体的遗传同质性较高。草鱼与两个鲤种群间的 ABS 值显著低于红鲤和鲤间的 ABS 值,这反映了三个种群间遗传关系的远近。同时也证实了 RAPD 标记对于鱼类种群间遗传关系的测定是比较灵敏的。

2.4 遗传距离

种群间遗传关系可用遗传距离定量描述。本试验测得草鱼与红鲤和鲤种间的遗传距

表2 草鱼和鲤种群内和种群间ABS值及遗传距离

Tab.2 Intra-and inter-population band sharing and genetic distances of grass carp and common carp

种 群 Genetic population	草 鱼 Grass carp	红 鲤 Red common carp	鲤 Common carp
草 鱼	0.8424	0.2583	0.2394
红 鲤	0.9362	0.7819	0.7162
鲤	1.2277	0.0947	0.7928

注:对角线及对角线以上为 ABS 值,对角线以下为遗传距离 Values on and above diagonal are average band sharing and values below diagonal are genetic distances.

离分别为 0.9362 和 1.2277(表 2),而红鲤和鲤间的遗传距离只有 0.0947。这反映了两个鲤种群间亲缘关系较近,而它们与草鱼种间亲缘关系则较远。

3 讨论

3.1 在世界主要养殖鱼类中,草鱼和鲤分别占 12.93% 和 13.48%,除鲢之外,居各鱼类之首。鲤的抗病力一般优于草鱼。为了探讨基因转移技术在鱼类育种中的应用,作者曾利用精子介导基因转移技术(Sperm-mediated gene transfer)将鲤的基因组 DNA(genomic DNA)导入草鱼基因组中,并获得了性状表达^[10]。从 DNA 分子水平上探究草鱼和鲤之间的遗传差异对于其基因资源的有效保护和开发利用具有重要意义,同时也为通过全基因组 DNA 导入获得转基因鱼的分子检测提供候选分子标记。

3.2 RAPD 是一种多位点(multi-locus)的 DNA 分子标记,它在群体遗传分析中的高灵敏度和高效率已为众多研究所证实。从本研究的结果来看,RAPD 指纹分析能相当灵敏地探测出鱼类种群内和种群间的遗传变异。加之与生化遗传标记相比较,RAPD 具有位点多,分布广泛,分析简便快捷等优点,因而它是鱼类遗传资源研究有力工具之一。

3.3 从不同引物所测得的带纹数和频率来看,差别较大(数值标准差大);不同引物所产生 RAPD 图谱多态性丰富程度差异也较大。有的引物虽然能明显地反映出草鱼和鲤之间的遗传差异,但在两个鲤鱼种群所产生的 RAPD 图谱则完全一致(如引物 OPA-15, CY02-19),不能反映出它们之间的遗传差异。因此,在进行此类遗传分析时,特别是对于遗传关系本来较近的种群间遗传距离测定时,筛选出较多的适宜的随机引物是提高分析灵敏度的关键之一。

3.4 本试验不仅获得了大量的草鱼和鲤的特异性分子标记,有的 RAPD 图谱(如 CY06-20)还探测出两个鲤种群间的特异性标记。种群特异性分子标记对于品种识别,遗传资源研究乃至转基因鱼(特别是总 DNA 导入)的分子检测都具有重要的应用价值,类似的种群特异性 RAPD 分子标记在一些家养动物如鸡,猪,牛的研究中亦有较多的报道。

参 考 文 献

- [1] Williams J GK, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18:6531—6535
- [2] Welsh J, et al. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(24):7213—7218
- [3] Kemp S J, et al. Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *B. taurus*. *Animal Genetics*, 1994, 25:83—88
- [4] Paran I, et al. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce using near-isogenic lines. *Genome*, 1991, 34:1024—1027.
- [5] Gwakina P S, et al. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Animal Genetics*, 1994, 25:89—94.
- [6] Rothuizen J, et al. Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display mendelian transmission. *Animal Genetics*, 1994, 25:13—18.
- [7] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 1990, 7:478—484.

- [8] Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: DNA Fingerprinting: Approaches and Applications, 113—126, Basel: Birkhauser Verlag, 1991
- [9] Kuhnlein U, et al. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: Development of a calibration curve using defined strains of chickens, *Genetics*, 1990. 125:161—165.
- [10] 章怀云等. 精子载体法将外源 DNA 导入草鱼受精卵获得性状转移. 水产学报, 1997, 21 (1): 74—76.

ASSESSMENT OF POPULATION GENETIC VARIATION OF GRASS CARP AND COMMON CARP USING RAPD FINGER PRINTS

Zhang Huaiyun, Liu Rongzong, Zhang Xuewen, Chen Tao, Xiao Tiaoyi
and Li Jinheng

(Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract Intra-and inter-population genetic variation of grass carp, red common carp and common carp was analysed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. The RAPD patterns of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were remarkably different from those of common carp (*Cyprinus carpio*), and the inter-population average band sharing between grass carp and the two common carps (red common carp and common carp) were 0.2583 and 0.2394, respectively, and the corresponding genetic distances between them were 0.9362 and 1.2277. However, the RAPD patterns of red common carp and common carp were very similar, with the average band sharing between them being 0.7162 and genetic distance 0.0947. The intra-population average band sharing of grass carp, red common carp and common carp were 0.8424, 0.7819 and 0.7928, respectively, average band frequency were 0.82, 0.71 and 0.74, respectively, and the genetic variability were 0.18, 0.29 and 0.26, respectively.

Key words Random amplified polymorphic DNA, Genetic marker, Genetic variation, Grass carp, Common carp.