

两个人工雌核发育红白锦鲤群体的 RAPD 标记分析

贾海波¹ 周 莉² 桂建芳²

(1. 湖北大学生命科学院, 武汉 430062; 2. 中国科学院水生生物研究所,

淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 采用 RAPD 方法, 对两个人工雌核发育红白锦鲤群体进行了多态性及分子标记分析。结果表明, 同一雌核发育群体具有基本一致的扩增产物, 而不同雌核发育群体间的扩增产物则有较大不同; 并从 30 个随机引物的扩增谱带中找到了 7 个引物 (Opo-7, Opo-9, Opo-12, Opo-14, Opi-4, Opi-8 和 Opi-10) 的扩增谱带可以作为两个不同雌核发育群体间的遗传标记。由 UPGMA 聚类法构建的分支系统树清晰地反映了两个雌核发育群体及其个体间的相互关系。

关键词: 锦鲤; 人工雌核发育; RAPD; 遗传标记

中图分类号: S956.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)01-0001-007

雌核发育 (Gynogenesis) 是一种特殊的生殖方式, 它与孤雌生殖 (Parthenogenesis) 有类似之处, 但也有不同^[1]。除了天然的雌核发育外, 生物学家对人工雌核发育的可能性也一直在进行探索与实践。据文献报道, 鱼类的雌核发育可以人工诱导的第一个证据是在 Opperman 的论文中提出的, 他用褐鲮 (*Salmo trutta*) 作为研究材料^[2]。从那以后, 人工雌核发育的研究十分活跃, 进展也很快, 不但有不少学者对它作了专论, 而且在鱼类纯系的快速构建、性别决定和性别人工控制以及基因图谱的建立等研究和应用中都有着重要的意义和价值^[3, 4]。

锦鲤是鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 的突变种, 作为观赏鱼, 主要体现在其华丽的体色及由此形成的多种多样的斑纹上^[5]。锦鲤种类很多, 根据其体色来分, 主要有红白、大正三色和昭和三色等。按照遗传学的基本原理, 锦鲤应该是控制体色的色素基因突变后等位基因发生重组的结果。然而迄今为止, 人们不但对锦鲤的色素基因尚一无所知, 而且对控制这些体色的遗传背景也知之甚少。为了稳定优质锦鲤的遗传性状, 并由此分析和了解锦鲤色彩多样性的遗传基础, 作者开展了锦鲤的人工雌核发育研究。本研究是在获得人工雌核发育锦鲤的基础上, 采用 RAPD 方法, 对两个人工雌核发育红白锦鲤群体进行了多态性及其分子标记研究。

收稿日期: 2000-07-14; 修订日期: 2001-01-20

基金项目: 国家重点基础研究项目 (G1999053908); 武汉市科技计划项目; 中国科学院基础研究项目 (KJ951-B1-607-3) 资助

作者简介: 贾海波 (1975—), 男, 湖北京山县人, 硕士研究生

通讯作者: 桂建芳

1 材料与方法

1.1 锦鲤的人工雌核发育群体的获得 亲鱼取自中国科学院水生生物研究所关桥鱼类遗传育种基地和武汉新世界水族公园。采用常规的人工雌核发育方法,即用经紫外线照射而遗传失活的团头鲂精子与锦鲤卵子授精激活其雌核发育,待授精 4 min 后,采用热休克处理(39℃, 1 min)保留第二极体,促进染色体组加倍^[6-8]。由于所用的精子取自团头鲂,其染色体数($n=24$)与锦鲤($n=50$)^[9]的差异甚远,其二倍体杂种不能存活,三倍体杂种虽能存活,但体色已回复到类似野生鲤的体色,与有花斑的锦鲤明显不同,因而存活下来的带有花斑的后代可认为是雌核发育二倍体锦鲤。

1.2 RAPD 反应仪器及试剂 PCR 扩增仪为美国 PERKIN ELMER CETUS 公司生产的 GeneAmp 2400, RAPD 扩增引物购自美国 Operon 公司, Taq 酶和 dNTP 是华美公司分装美国 Promega 公司的产品。

1.3 基因组 DNA 的提取 取新鲜活鱼,抽血 0.5 mL,弃血浆。用生理盐水洗涤红细胞两次,再加入 10 倍体积的匀浆缓冲液在低温下充分匀浆(缓冲液组分: 10 mmol/L Tris-HCl, pH= 8.0, 75 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% SDS)及 100 μg/mL 蛋白酶 K55 充分消化 2 h 后,进行酚 氯仿 异戊醇(25:24:1)抽提,将所得上清液加入 1/5 体积的 2 mol/L NaAc 和 2 倍体积的冰无水乙醇沉淀。用适量的 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH= 8.0),置-20℃冰箱备用。再以 Lamda DNA 为标准,用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 的溴化乙锭)电泳(5-10 V/cm) 2h,紫外灯下拍照,确定 DNA 的质量及浓度。

1.4 RAPD 检测 RAPD 反应体系的总体积为 25 μL,内含 2.5 μL 10 倍 Reaction Buffer, 1.6 μL 25 mmol/L MgCl₂, 2 μL 2.5 mmol/L 的 dNTP 混合物, 1 μL 引物(约 15 ng), 10—20 ng 模板 DNA, 0.5 单位 Taq 酶, 15.9 μL 纯水。RAPD 反应扩增程序同周莉等的报道^[10]。RAPD 扩增产物的分离和鉴定在 1.5% 琼脂糖电泳凝胶上(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)进行,紫外灯下拍照。

1.5 数据的统计 根据 Nei 和 Li 的相似率公式^[11]进行数据分析。相似率 = $2 \times N_{ab} / (N_a + N_b) \times 100\%$, 其中 N_{ab} 表示个体 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目, N_a 为个体 a 具有的 DNA 扩增片段的数目, N_b 为个体 b 具有的 DNA 扩增片段的数目。遗传距离 = $1 - \text{相似率}$ 。根据 RAPDPLOT 软件作出其不同个体的 UPGMA 图谱。

2 结果

2.1 个体和群体间的遗传距离

雌核发育锦鲤由于母本遗传物质加倍,纯度增加,使其遗传距离明显降低。本研究共使用了 30 个引物,其中 27 个扩增效果良好,产生了清晰的 DNA 带纹。扩增片段的大小一般在 0.5 至 3 kb 之间,每个引物扩增的片段数在 3 至 9 之间。对 1710 条带(每个个体 171 条带)的统计分析结果表明,同一雌核发育群体内的不同个体之间的遗传距离都较小,其中最大的是 RW1—4 和 RW1—5(其值为 0.122807),最小的是 RW2—1 和 RW2—2(其值为 0.023392)(表 1)。但是,不同雌核发育群体之间的遗传距离都比较大,

其中最大的是 RW 1—1 和 RW2—4(其值为 0. 286550) , 最小的是 RW 1—4 和 RW2—3 (其值为 0. 187135) (表 2)。

表 1 两个雌核发育红白锦鲤 10 个个体间的遗传距离

Tab. 1 The genetic distances between the ten individuals of two gynogenetic populations of Red-white ornamental carp

	RW1- 1	RW1- 2	RW1- 3	RW1- 4	RW1- 5	RW2- 1	RW2- 2	RW2- 3	RW2- 4	RW2- 5
RW1- 1	0. 0									
RW1- 2	0. 093567	0. 0								
RW1- 3	0. 070175	0. 035088	0. 0							
RW1- 4	0. 111111	0. 052632	0. 076023	0. 0						
RW1- 5	0. 093567	0. 070175	0. 070175	0. 122807	0. 0					
RW2- 1	0. 251462	0. 216374	0. 22807	0. 210526	0. 251462	0. 0				
RW2- 2	0. 251462	0. 22807	0. 239766	0. 210526	0. 251462	0. 023392	0. 0			
RW2- 3	0. 263158	0. 204678	0. 228070	0. 187135	0. 228070	0. 081871	0. 070175	0. 0		
RW2- 4	0. 286550	0. 228070	0. 239766	0. 222222	0. 251462	0. 081871	0. 093567	0. 058480	0. 0	
RW2- 5	0. 274854	0. 216374	0. 228070	0. 198830	0. 263158	0. 070175	0. 081871	0. 070175	0. 035088	0. 0

表 2 两个雌核发育红白锦鲤群体内和群体间的平均遗传距离

Tab. 2 The average genetic distances within and between the two gynogenetic populations of red-white ornamental carp

	RW 1	RW 2
RW1	0. 053021 ± 0. 044177	
RW2	0. 234386 ± 0. 024225	0. 044444 ± 0. 035782

表 3 由 7 个引物扩增出的特异 DNA 带

Tab. 3 Specific DNA fragments amplified by 7 random primers

引物 Primers	序列 Sequences	特异片段及其大小 Specific fragments and their size	群体 Population
Opo-7	CAGCACTGAC	1500bp	RW 1
Opo-9	TCCACGCAA	2000bp	RW 1
Opo-12	CAGTGCTGTG	1400bp, 1200bp	RW 1
		1000bp	RW 2
Opo-14	AGCATGGCTC	1400bp	RW 1
		700bp	RW 2
Opj-4	CCGAACACGG	1200bp, 900bp	RW 1
Opj-8	CATACCGTGG	1800bp	RW 1
Opj-10	AAGCCCGAGG	1200bp	RW 1

2.2 不同雌核发育群体特有 DNA 片段的检出

在扩增出 DNA 带的 27 个随机引物中, 有 7 个引物在种群间产生了特异于不同雌核发育群体的 DNA 片段, 这 7 个引物分别是 Opo-7, Opo-9, Opo-12, Opo-14, O_{pj}-4, O_{pj}-8 和 O_{pj}-10(表 3)。如图 1 所示, 引物 Opo-14 扩增出了一条大小约为 1400 bp 特异于雌核发育群体 1 的片段和一条大小约为 700 bp 特异于雌核发育群体 2 的片段; 引物 O_{pj}-8 在雌核发育群体 1 中扩增出了大小为 1800 bp 的特异片段。因此, 这 7 种引物产生的 RAPD 图谱及其特异片段可以作为区分这两个雌核发育群体的分子遗传标记。

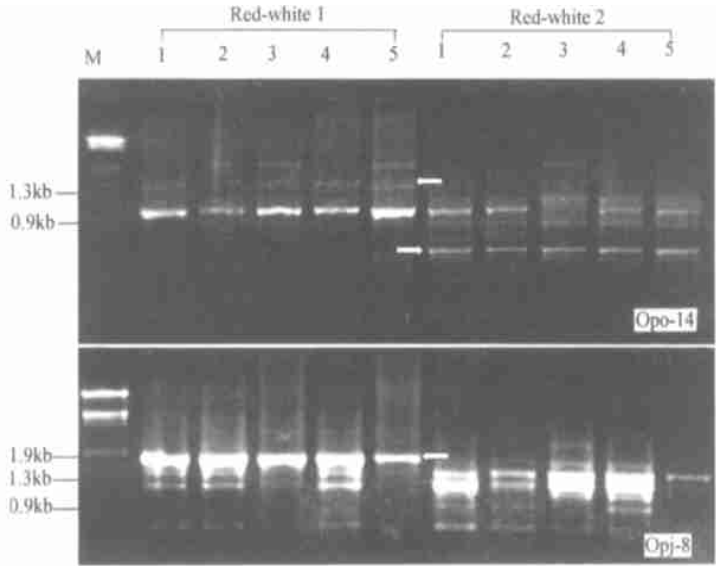


图 1 由引物 Opo-14 和 Opi-8 扩增出的两个典型 RAPD 带型的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of two typical RAPD band patterns produced by the Opo-14 and Opi-8 primers

2.3 分支系统树分析

从其分支树状图可以看出(图 2), 两个不同的雌核发育系可以通过 RAPD 方法检测

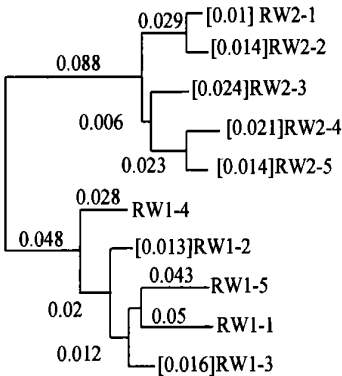


图 2 两个雌核发育群体 10 个个体的 UPGMA 分支树状图

Fig. 2 Dendrogram of 10 individuals in the two gynogenetic populations obtained by UPGMA cluster analysis

出来, 红白雌核发育锦鲤群体 1 的五个个体(即 RW1—1, RW1—2, RW1—3, RW1—4, RW1—5)聚在一起, 而红白雌核发育锦鲤群体 2 的另五个个体(RW2—1, RW2—2, RW2—3, RW2—4, RW2—5)聚在一起, 由分子系统树得到的各个雌核发育个体的亲缘关系较好地反映了被研究个体的来源。

3 讨论

RAPD 是一种以单个合成的寡聚核苷酸为引物的 PCR 技术, 由于它具有快速灵敏, 安全, 且无须分子杂交, 故已成为群体遗传学和进化生物学研究十分重要的分子生物学技术。RAPD 技术已在品种鉴定, 亲缘关系的探讨及遗传作图等方面获得了广泛应用。周莉等曾采用 RAPD 技术揭示出了银鲫复合种和异育银鲫异源遗传物质整入的分子证据以及银鲫雌核发育克隆间的遗传异质性^[12]。本研究通过对两个人工雌核发育红白锦鲤群体进行的 RAPD 多态性分析, 从 30 个随机引物的扩增谱带中找到了 7 个引物(Opo-7, Opo-9, Opo-12, Opo-14, Opj-4, Opj-8 和 Opj-10)的扩增谱带可以作为两个不同雌核发育群体间的遗传标记。

从血液中直接提取 DNA 是一种无损伤性取样, 根据血液具体的一些特点, 对传统的 DNA 提取法进行了适当的修改。如用 0.8% NaCl 洗涤红细胞, 直至全部沉淀均是白色时为止。为选取 RAPD 最佳扩增体系和条件, 依次进行了各个反应物的梯度对比实验, 确定了扩增反应的合适反应条件。选取 38.5 为退火温度, 略高于以前文献中所报道的 36 。根据 Tajima 的 DNA 序列抽样分布理论^[13], 在 DNA 水平上估计群体变异时, 样本数量 $N = 10$ (甚至 5) 就可以了, 并且雌核发育锦鲤由于母本遗传物质加倍, 纯合度增加, 使其遗传距离明显降低, 因此, 本研究从每个红白雌核发育群体中只各随机选取了 5 个个体。

人工雌核发育是目前鱼类遗传育种的有效方法之一。通过人工雌核发育可以快速建立纯系(Homozygous strain), 一次雌核发育相当于 8—10 个世代同胞兄妹交配^[14]。锦鲤繁育实践表明, 正常交配繁殖的正品率一般仅占 0.1%。鉴于此, 通过人工雌核发育在锦鲤中选育出观赏性状稳定遗传的纯系, 以便快速繁殖出完全满足人们需要的子代。但是, 在人工雌核发育中还有很多问题需要解决。对其操作过程和机理结合发育过程和遗传行为进行更加深入的研究, 将有助于人们进行更有效的操作以构建有用的人工雌核发育系。

在人工雌核发育及雄核发育鱼类的遗传多态性及其分子标记研究方面, Carter 等曾采用人微卫星探针(Human minisatellite probes)分析了雌核发育蓝罗非鱼(*Oreochromis aureus*)的父系影响^[15]。Corley-Smith 等通过 RAPD 方法, 分析了雄核发育斑马鱼(*Danio rerio*)的遗传标记, 发现父系中有 7 个特定的遗传标记位点(3 个纯合位点, 4 个杂合位点), 母本中有 16 个特定的遗传标记位点(5 个纯合位点, 11 个杂合位点), 鉴定的纯合率达 0.99975586, 同时可以准确标记雄核发育单倍体, 二倍体及杂合体^[16]。杨书婷和桂建芳的研究表明, 在两尾亲本来源不同的人工雌核发育鲢群体间存在有明显的同工酶酶谱差异, 而群体内个体之间的同工酶谱型较一致。本研究由 UPGMA 聚类法构建的分支系统树也清晰地反映了两个人工雌核发育红白锦鲤群体间的这种遗传异质性和其群体内个体间的遗传相似性。

参考文献:

- [1] 桂建芳. 单性脊椎动物的进化遗传学[J]. 自然杂志, 1989, **12**(2): 116—121
- [2] Oppermann K. Die entwicklung von forelleneiern nach Befruchtung mit radiumstrahlten Samenfadern [J]. *Arch. Mikrosk. Anat.* 1913, **83**: 141—189
- [3] Pandian T J, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish [J]. *Hydrobiologia*, 1998, **384**: 167—243
- [4] 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999
- [5] 桂建芳. 锦鲤欣赏[J]. 水利渔业, 1986, (5): 40—42
- [6] 桂建芳, 梁绍昌, 孙建民. 鱼类染色体组操作的研究、静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫[J]. 水生生物学报, 1990, **14**(4): 336—344
- [7] 桂建芳, 孙建民, 梁绍昌, 鱼类染色体组操作的研究、静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体[J]. 水生生物学报, 1991, **15**(4): 333—342
- [8] 杨书婷, 桂建芳, 两个雌核发育系白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定[J]. 水生生物学报, 1999, **23**(3): 264—268
- [9] 余先觉, 周敏, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体[M]. 北京: 科学出版社, 1989
- [10] 周莉, 樊连春, 桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整入的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—306
- [11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **76**: 5269—5273
- [12] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch based on detection of RAPD molecular markers [J]. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 2000, **88**: 133—139
- [13] Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations [J]. *Genetics*, 1983, **105**: 437—445
- [14] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of homozygous dipliod zebra fish [J]. *Nature*, 1981, **291**: 293—296
- [15] Carter R E, Mair, G C, Skibinski D O F, et al. The amplification of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia [J]. *Aquaculture*, 1991, **95**: 41—52
- [16] Corley-Smith G E, Lim G J, Brandhorst BP. Production of androgenetic Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Genetics*, 1996, **142**: 1265—1278

RAPD MARKER ANALYSIS OF TWO ARTIFICIAL GYNOGENETIC POPULATIONS IN RED-WHITE ORNAMENTAL CARP

JIA Hai-bo¹, ZHOU Li² and GUI Jian-fang²

(1. Life Science College, Hubei University, Wuhan 430062; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Genetic heterogeneity and molecular markers were analyzed in two artificial gynogenetic populations of Red-white ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.) by RAPD technique, using 30 10-nucleotide primers. Similar banding patterns were observed among individuals within each gynogenetic population, whereas obvious differences were detected between the two gynogenetic populations. 7 primers, such as Opo-7, Opo-9, Opo-12, Opo-14, Opj-4, Opj-8 and Opj-10 were observed to produce specific bands, and these bands could be used as molecular markers for discriminating the two different gynogenetic populations. Average genetic distances within and among the two populations clearly indicated their origin and relationship. A phylogenetic tree was constructed using UPGMA cluster analysis based on a total of 1710 distinguishable fragments (171 per individual). All individuals in the first gynogenetic population were clustered into one group, while all the individuals originated from the second were joined into another group.

Key words: Ornamental carp; Artificial gynogenesis; RAPD; Genetic marker