

研究简报

鲢两个人工雌核发育家系的 RAPD 分析

毛 晗 周 莉 桂建芳

(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)

RAPD MARKER ANALYSIS OF TWO ARTIFICIAL GYNOGENETIC FAMILIES IN SILVER CARP

MAO Han, ZHOU Li and GUI Jian-Fang

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 鲢; 人工雌核发育; RAPD; 遗传标记

Key words: Silver carp; RAPD; Artificial gynogenesis; Genetic markers

中图分类号: S956.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)05-0547-004

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix* Curia et Valenciennes)为我国著名的四大家鱼之一,由于其滤食浮游植物,可以有效地降低富营养化水体中浮游生物的含量,因而除了单养外,也大量应用于池塘混养,对水产业有着巨大的贡献,在淡水养殖业及淡水捕捞业中一直占有重要的经济地位^[1,2]。但由于鲢繁殖周期较长,尚未进行长期的选育工作,在许多人工繁殖种群中已出现了日益严重的经济性状衰退现象^[3]。因此,寻求行之有效的选育方案,了解其遗传背景及其可供选育参照的遗传标记,是鲢遗传选育研究的重要突破口。杨书婷等曾采用基因组操作技术,获得了不同的人工雌核发育鲢家系,并借助于同工酶和转铁蛋白等分析方法对两个不同的人工雌核发育家系进行了遗传多态性分析,并找到了较为明确的可区分这两个人工雌核发育白鲢家系的生化遗传标记^[4,5]。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)是建立在 PCR 基础上的分子标记技术,具有简便、准确、快速的特点,既有大量的随机引物可供选择,又不受种属的限制,因此被广泛的应用于种属特异性鉴定、外源基因示踪、进化关系确立、基因定位、基因分离、生殖方式判定和遗传多样性分析等^[6-11]。本研究欲通过 RAPD 分析方法,进一步分析两个人工雌核发育鲢家系的遗传特征,并由此寻找其 DNA 片段遗传标记,为更为合理和更为有效地进行良种选育及进一步建立良种人

工繁育计划提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 人工雌核发育鲢的获得 用于人工雌核发育的鲢亲鱼和基因组操作方法同于杨书婷等以前的报道^[4,5]。用于本研究的两个人工雌核发育鲢家系分别于 1997 年和 1998 年获得,其编号分别为 Hy-971 和 Hy-981。

1.2 基因组总 DNA 的提取 基因组总 DNA 的提取参照标准酚-氯仿抽提程序进行^[12]。以 λ DNA 为标准,用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭)电泳(5-10V/cm) 2h,紫外灯下拍照,确定 DNA 的质量及浓度。

1.3 RAPD 反应 PCR 扩增仪为美国 PE 公司生产的 GeneAmp 9600, RAPD 扩增引物, Taq 酶和 dNTP 均购自上海生工生物有限公司。RAPD 反应体系及其扩增程序与 Zhou 等报道的^[9,10]基本相同,具体程序为:在 94℃ 预变性 4min 后,进行 40 个扩增循环,每个循环包括 94℃ 变性 40s, 38.5℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1min 20s。最后一次循环结束后 72℃ 延伸 7min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离。扩增片段大小通过与宝生物 DNA Marker DL2,000 比较而得以记录。电泳凝胶经溴化乙锭染色后,通过白光/紫外光图像扫描系统(Ultra Violet Products)分析。

1.4 数据统计及分析 按照 RAPD 扩增获得的数据,以 1 或

收稿日期: 2002-12-04; 修订日期: 2003-05-03

基金项目: 国家科技攻关项目; 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-1-05)资助

作者简介: 毛 晗(1976-),男,湖北黄梅县人;硕士研究生

0 分别表示扩增片段的有或无输入计算机程序,采用计算机软件 RAPDinstance(1.04)和 Apostol 的公式^[13] 进行数据分析。个体间和两个人工雌核发育家系间相互关系的分支图分别通过 PHYLIP3.57C 软件中的类平均聚类法 UPGMA^[14] 进行构建。

2 结果

2.1 扩增片段的大小及其遗传距离分析

分别从人工雌核发育鲢家系 Hy-971 和 Hy-981 中随机选取了 8 尾和 7 尾个体用于 RAPD 分析,在用于扩增的 28 个引物中,有 26 个引物扩增效果良好,可以用于统计分析。并统

计分析了 127 条带。扩增片段的大小从 0.3kb 至 3kb。同一雌核发育家系不同个体间的遗传距离都比较小,其中最大的是 Hy-971-5 和 Hy-971-6(其值为 0.198),最小的是 Hy-971-1 和 Hy-971-2(其值为 0.0887)(表 1)。Hy-971 和 Hy-981 家系内个体的平均遗传距离分别为 0.109 和 0.094(表 2)。但是,不同人工雌核发育鲢家系个体之间的遗传距离都比较大,其中最大的是 Hy-971-2 和 Hy-981-3(其值为 0.307),最小的是 Hy-971-5 和 Hy-981-1(其值为 0.217)(表 1)。Hy-971 和 Hy-981 家系间个体的平均遗传距离为 0.265(表 2)。

表 1 两个不同雌核发育鲢家系 15 个个体的遗传距离

Tab. 1 The genetic distances between the ten individuals of two different gynogenetic families of silver carp															
	Hy-971-1	Hy-971-2	Hy-971-3	Hy-971-4	Hy-971-5	Hy-971-6	Hy-971-7	Hy-971-8	Hy-981-1	Hy-981-2	Hy-981-3	Hy-981-4	Hy-981-5	Hy-981-6	Hy-981-7
Hy-981-1	0.0														
Hy-971-2	0.0887	0.0													
Hy-971-3	0.125	0.0887	0.0												
Hy-971-4	0.154	0.125	0.153	0.0											
Hy-971-5	0.125	0.153	0.177	0.0886	0.0										
Hy-971-6	0.153	0.125	0.088	0.177	0.198	0.0									
Hy-971-7	0.177	0.153	0.125	0.153	0.177	0.0887	0.0								
Hy-971-8	0.154	0.177	0.153	0.177	0.153	0.125	0.0887	0.0							
Hy-981-1	0.266	0.280	0.266	0.250	0.234	0.280	0.266	0.250	0.0						
Hy-981-2	0.251	0.266	0.250	0.266	0.250	0.266	0.250	0.234	0.0887	0.0					
Hy-981-3	0.294	0.307	0.294	0.280	0.266	0.280	0.266	0.250	0.125	0.153	0.0				
Hy-981-4	0.281	0.266	0.250	0.234	0.250	0.266	0.250	0.266	0.153	0.177	0.153	0.0			
Hy-981-5	0.294	0.280	0.266	0.250	0.266	0.280	0.266	0.280	0.125	0.153	0.125	0.0887	0.0		
Hy-981-6	0.281	0.294	0.280	0.266	0.250	0.294	0.280	0.266	0.887	0.125	0.0887	0.125	0.0887	0.0	
Hy-981-7	0.251	0.266	0.250	0.234	0.217	0.266	0.250	0.234	0.0887	0.125	0.153	0.125	0.153	0.125	0.0

表 2 两个不同雌核发育鲢家系内及其家系间的平均遗传距离

Tab.2 Average genetic distances between and within the two different gynogenetic families of silver carp		
	Hy-971	Hy-981
Hy-971	0.109±0.0662	
Hy-981	0.265±0.0184	0.0941±0.0603

2.2 两个不同雌核发育鲢家系特有 DNA 片段的检出

在 26 个引物扩增产生的 RAPD 图谱中,发现 3 个引物(S351, S451, 和 S348)产生的 RAPD 图谱在两个人工雌核发育鲢家系间出现了特异的 DNA 片段(表 3)。如图 1 所示,引物 S351 扩增出了一条特异于 Hy-971 长约 800bp 的 DNA 带;引物 S451 扩增出了两条特异的 DNA 片段,一条特异于 Hy-971,长约 245bp,另一条特异于 Hy-981,长约 120bp;引物 S348 扩增出了两条特异于 Hy-971 的 DNA 片段,分别长约 1200bp 和 450bp。

表 3 由 3 个引物扩增出的特异于不同人工雌核发育鲢家系的 DNA 片段

Tab.3 Specific DNA fragments amplified by 3 random primers from two gynogenetic families of silver carp			
引物 Primer	序列 Sequence	特异片段长度 Length	家系 Family
S348	CATACCGTGG	1200bp	Hy-971
		450bp	Hy-971
S351	ACTCCTGCCA	800bp	Hy-971
S451	GACAGGAGGT	480bp	Hy-971
		275bp	Hy-981

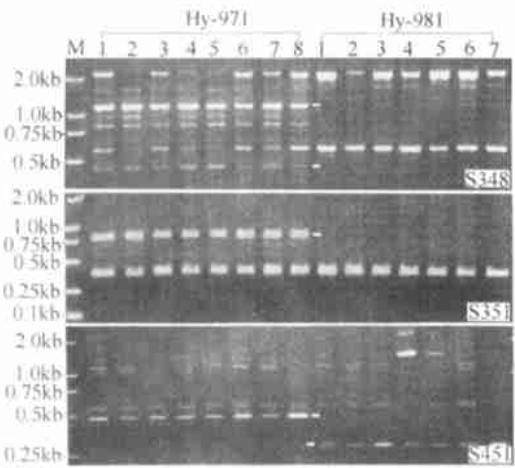


图 1 引物 S348、S351 和 S451 扩增的 3 组典型的 RAPD 产物的电泳图, 箭头示特异的 DNA 片段

Fig 1 Electrophoretogram of 3 typic RAPD products obtained from primers S348, S351 and S451, the arrows show the specific DNA fragments

2.3 分支系统树分析

依据 RAPD 谱带经计算机软件程序构建的分支树状图(图 2), 可明显地将鲢两个不同的人工雌核发育家系的所有个体区分开来。如属于 Hy 971 的 8 尾个体(即 Hy 971-1, Hy 971-2, Hy 971-3, Hy 971-4, Hy 971-5, Hy 971-6, Hy 971-7, Hy 971-8)聚成一个分支, 而属于 Hy 981 的另 7 尾个体(Hy 981-1, Hy 981-2, Hy 981-3, Hy 981-4, Hy 981-5, Hy 981-6, Hy 981-7)聚成另一个分支。

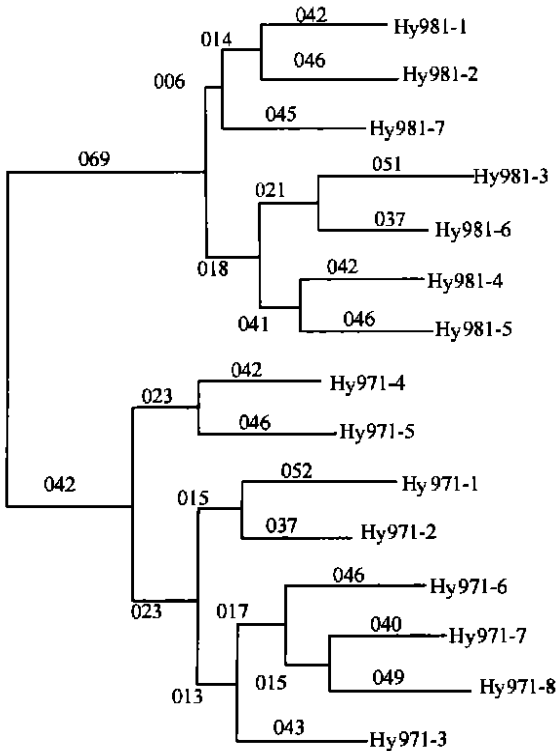


图 2 根据两个雌核发育家系的 15 个个体的扩增结果, 采用 UPGMA 聚类法构建的分支图

Fig. 2 Dendrogram of 15 individuals from two gynogenetic families of silver carp obtained by UPGMA analysis

3 讨论

在鱼类遗传育种工作中, 人工雌核发育是快速建立纯系的有效方法, 因为一次人工雌核发育所获后代的遗传纯度相当于 8—10 个世代的同胞兄妹交配^[3]。鲢由于繁育周期长, 通过人工雌核发育可以在有限时间内得到遗传特性相对一致的可用作育种材料的不同家系, 缩短选育时间。然而, 要想获得优良的育种材料, 并实施切实可行的育种计划, 除通过人工雌核发育技术快速获得育种材料之外, 关键是要了解所研究对象的遗传背景, 找到辨别优劣的标记。近年来, 本实验室已在大量研究的基础上, 发展起来了可用于鱼类种内不同品系鉴定的转铁蛋白^[15]、RAPD^[9-11]、SCAR^[16]和微卫星标记^[17, 18]等分子标记技术。周莉等曾用 RAPD 技术成功地区分了银鲫的五个不同雌核发育系^[9], 证明异育银鲫和银鲫复合种中整合了外源的遗传物质^[19], 揭示出银鲫卵子具有雌核生殖和两性生殖两种发育方式的分子遗传证据^[10]。贾海波在对两个人工雌核发育锦鲤群体的 RAPD 检测分析中, 找到了可以作为区分两个雌核发育锦鲤群体的遗传标记^[20]。本研究采用 RAPD 检测技术, 不但揭示出两个人工雌核发育鲢家系的遗传背景存在明确差异, 而且检测到可区分这两个雌核发育家系的特异 DNA 片段。进一步研究将采用本实验室 Zhou 等发展起来的 SCAR 标记技术^[16], 在克隆并测序了本研究所找到的特异 RAPD 标记的基础上, 根据所测得的 DNA 片段的碱基序列, 设计合成相应引物, 利用该引物通过 PCR 就可简捷有效地扩增出可区分鲢不同雌核发育家系的 DNA 片段标记。

本研究再一次表明, RAPD 作为一种指纹分析技术应用于鱼类雌核发育家系分析及其分子遗传标记鉴定是一种有效的方法。以前, 杨书婷和桂建芳采用同工酶技术, 曾对本文研究的这两个人工雌核发育鲢家系进行了研究。结果表明, 不同的人工雌核发育家系间存在明显的同工酶酶谱差异, 家系内的个体的谱型较为一致^[4]。本研究通过 RAPD 技术分析, 由 UPGMA 聚类法构建的分支系统树清晰地反映出两个雌核发育系家系内个体的遗传相似性和两个家系间的遗传异质性, 与同工酶的研究结果吻合, 并为之提供了 DNA 水平上的证据。

在检查和统计人工雌核发育白鲢养殖生长结果时还发现, 在同一个雌核发育系内不同个体存在着显著的生长差异。其原因可能是由于雌核发育促使基因纯合, 由具有优良基因型的卵子发育而成的个体更优, 而由具有劣势基因型的卵子发育而成的个体更劣的结果。下一步工作将进一步应用 RAPD 和其他分子生物学技术对生长差异显著的个体进行分析, 以期找到与生长速度等经济性状相关的 DNA 分子或相关基因标记。

参考文献:

[1] Liu J K, He B W. Aquaculture of Freshwater Fishes in China (3rd edition) [M]. Beijing: Science Press. [刘建康, 何碧梧. 中国淡水鱼类养殖学. 北京, 科学出版社. 1992]

[2] Wu L J, Wang Z X. Biochemical genetic structure and variation in a

- natural population of silver carp from the middle reaches of the Yangze River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21**(2): 157—162. [吴力钊, 王祖熊. 长江中游鲢鱼天然种群的生化遗传结构及变异. 水生生物学报, 1997, **21**(2): 157—162]
- [3] Wu Q J, Gui J F. Fish genetics and breeding engineering[M]. Shanghai: Scientific and Technology Publisher. 1999. [吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海, 上海科学技术出版社, 1999]
- [4] Yang S T, Gui J F. Isozyme analysis and preliminary confirmation of the genetic markers in two artificial gynogenetic populations of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(3): 264—268. [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]
- [5] Yang S T, Wang Y, Gui J F. research on diversity of serum esterase and transferrin among different populations of gynogenetic diploid silver carp [A]. *Fishery technical innovation facing to the 21th century* Beijing: ocean press. 2000, 178—182. [杨书婷, 汪洋, 桂建芳. 雌核发育二倍体白鲢不同群体间血细胞酯酶与血清转铁蛋白多态性研究. 中国水产学会编: 迈向 21 世纪的渔业科技创新, 北京: 海洋出版社, 2000, 178—182]
- [6] Khana P D, Dancik B P. Rapid identification of white Engelmann spruce species by RAPD markers [J]. *Theor. Appl. Genet*, 1996, **92**: 46—52
- [7] Sastry J G, Ranakrishna W, Sivaramakrishnan S. DNA fingerprinting detects genetic variability in the pearl millet downy mildew pathogen (*Sclerotinia graminicola*) [J]. *Theor. Appl. Genet*, 1995, **91**: 856—861
- [8] Schnell R J, Ronning C M, Knight R J. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers [J]. *Theor. Appl. Genet*, 1995, **90**: 269—274
- [9] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity and detection of molecular markers by RAPD techniques among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch. *Cytogenet* [J]. *Cell Genet.*, 2000a, **88**: 133—139
- [10] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) as revealed by RAPD assays [J]. *J. Mol. Evol.*, 2001b, **51**: 498—506
- [11] Zhou L, Gui J F. Studies on genetic diversity in gonochoristic offspring produced from mating between two different gynogenetic clones of silver crucian carp. [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*. 2001, **34**(3): 169—176. [周莉, 桂建芳. 银鲫两个雌核发育克隆间两性生殖子代的遗传多样性分析. 实验生物学报, 2001, **34**(3): 169—176]
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual ed2 [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989, 463—468
- [13] Apostol B L. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, **86**: 991—1000
- [14] Black W C. Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 50: Species Diagnostics Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods [M]. *Humana Press* (C. L. Clapp ed.), 1995, 39—55
- [15] Yang L, Yang S T, Wei X H, Gui J F. 2001. Genetic diversity among different clones of the gynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio*, revealed by transferrin and isozyme markers [J]. *Biochemical Genetics*, **39**(5/6): 213—225
- [16] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Molecular analysis of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) clones by SCAR markers [J]. *Aquaculture*, 2001, **201**: 219—228
- [17] Zhou L, Liu J X, Gui J F. Preliminary investigation on genetic diversity of gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) detected by microsatellite DNA. [J]. *Zoological Research*, 2001, **22**(4): 257—264. [周莉, 刘静霞, 桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探. 动物学研究, 2001, **22**(4): 257—264]
- [18] Liu J X, Zhou L, Zhao Z S, et al. Studies on microsatellite markers of four artificial gynogenetic families in ornamental carp. [J]. *Zoological research*, 2002, **23**(2): 97—105. [刘静霞, 周莉, 赵振山, 等. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究[J]. 动物学研究, 2002, **23**(2): 97—105]
- [19] Zhou L, Fan L C, Gui J F. RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in multiple species of silver crucian carp. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(4): 301—306. [周莉, 樊连春, 桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整合的 RAPD 分析. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—306]
- [20] Jia H B, Zhou L, Gui J F. RAPD marker analysis of two artificial gynogenetic populations in red white ornamental carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(1): 1—7. [贾海波, 周莉, 桂建芳. 两个人工雌核发育红白锦鲤群体的 RAPD 标记分析. 水生生物学报, 2002, **26**(1): 1—7]