

RAPD-SCAR在鱼类种质鉴定中的应用及前景

张平¹, 缪为民², 董在杰², 袁新华², 苏志烽¹

(¹南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

²中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要:种质是利用和改良动植物、微生物的物质基础,更是实施各个育种途径的原材料,因此优良种质鉴定是一个很关键的问题。种质鉴定方法已由形态水平发展到蛋白质和DNA分子水平。RAPD技术具有敏感、快速、简便、产量高、重复性好及检测容易等突出优点,广泛应用于种质鉴定中,但也有不足之处。基于RAPD标记技术建立起来的SCAR(Sequence Characterized Amplified Region)标记克服了RAPD标记的不足,操作简捷,特异性和重复性较高,是一种有效的分子标记。RAPD-SCAR分子标记技术的利用使种质鉴定更为快速准确,提高了育种速度,缩短了育种周期,为相关的研究工作提供分子遗传学依据。

关键词:种质鉴定;SCAR;RAPD

中图分类号:S9-0 文献标识码:A

Application of Multiplex Molecular Markers of RAPD and SCAR in Germplasm Identification of Fishes

Zhang Ping¹, Miao Weimin², Dong Zaijie², Yuan Xinhua², Su Zhifeng¹

(¹Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi Jiangsu 214081;

²Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi Jiangsu 214081)

Abstract: As the fundamental material of animals, plants and micro-organisms breeding Germplasm identification is a critical issue. Germplasm identification is gradually developed to protein and DNA molecular level. For its sensitivity, rapidity, simpleness and convenience, high yield, good repeatability and easy detection, RAPD technology has been widely used in germplasm identification. But, it also has shortcoming. Established on RAPD, SCAR marker is superior to RAPD markers because of its simple operation, high specificity and reproducibility. SCAR has become an effective molecular marker. The Application of RAPD-SCAR not only makes germplasm identification faster and more accurate, but also improves breeding efficiency, shortens breeding period, and provides genetical basis for other relevant studies.

Key words: germplasm identification, SCAR, RAPD

种质是决定生物遗传性状,并将遗传信息从亲代传递给子代的遗传物质的总体。凡是携带遗传物质的载体都可称为种质。它能决定生物种性,并能在亲代与子代之间传递。鱼类种质鉴定实际上是进行鱼类种群遗传结构的研究^[1],它伴随着鱼类种群遗传学的发展,由形态水平发展到蛋白质和DNA分子水平。近年

来,遗传改良和新品种的直接引进大大丰富了中国水产种质资源,提高了渔业产量和经济效益^[2]。但对一些主要养殖鱼类的遗传背景了解不够全面,对于鱼类的种质资源基本上没有建立起完整的良种鉴定、选育和养殖的评价体系。以往的种质鉴定,主要采用形态观察、生理生态特征和同工酶分析的方法,当亲缘关系

基金项目:农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金课题(BM2007-05)。

第一作者简介:张平,女,1982出生,山东邹城人,硕士研究生,从事鱼类遗传育种研究。通信地址:214081 无锡山水西路9号无锡渔业学院, E-mail: superping100@163.com。

通讯作者:缪为民,男,1961年出生,江苏南通人,研究员。

收稿日期:2008-12-11,修回日期:2009-01-25。

很近或出现趋同进化 (Convergence)、平行进化 (Parallel evolution) 或品系、杂交种的形态区分不明显时,难以准确鉴别且效率较低、误差较大,从而使物种、品系的区分出现困难^[3-5]。因此,需要从分子生物学的角度寻求一种更好的鉴定物种方法。

遗传标记是基因型的一种特殊表现形式,主要经历了形态学标记、染色体标记、同工酶标记和 DNA 标记四个阶段。基于基因或基因组差异的分子标记技术对物种进行鉴定是最为准确和可靠的。已经发展起来的分子标记有多种,包括: RFLPs, AFLPs, SSRs, ISSRs, RAPD 及在其基础之上发展起来的 SCAR 标记技术。长期以来 RAPD 作为一种灵活、简便、快速的分子标记,广泛应用于物种标记鉴定、构建遗传图谱、系统发育和亲缘关系分析、种群划分及种群遗传多样性分析中。与其他技术一样, RAPD 也存在不足之处。1993 年, Paran 和 Mihcelmores 基于 RAPD 建立了一种可靠、稳定、可长期利用的标记技术,即序列特定扩增区域标记 (Sequence Characterized Applied Region), 简称 SCAR 标记^[6]。SCAR 标记操作简便、特异性和重复性高,可将 RAPD 标记转化为稳定的 SCAR 标记,广泛应用于动植物和微生物的遗传学研究中,成为一种有效的分子标记。

1 RAPD 技术的原理及应用

RAPD 技术继承了 PCR 敏感、快速、简便、产量高、重复性好及检测容易等突出优点,同时无需了解物种相关分子生物学信息,因而得到了广泛应用^[7]。

1.1 RAPD 技术的原理

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是指随机扩增的多态性 DNA。根据 PCR (DNA 聚合酶链式反应), 以一个 10 碱基的任意序列的寡核苷酸片段为引物, 从组织中分离出来的基因组 DNA 为模板, 在未知序列的基因组 DNA 上进行随机的 PCR 扩增, 通过基因放大器进行多态性 DNA 片段的随机合成, 产生长度为 200~3500 bp 的 DNA 片段。模板 DNA 经 94 °C 变性解链后, 在较低的温度下 (一般低于 40 °C) 与随机引物退火, 这时会有许多位点可以与引物互补配对形成双链结构, 启动 DNA 的合成, 然后 72 °C 延伸。如果所用引物与基因组结合位点发生 DNA 片段的插入、缺失或碱基突变, 就会使 PCR 产物增加、缺失或发生分子量的改变, 从而产生片段大小不等的扩增产物, 通过电泳分离和染色便可得到许多不同的条带, 从中筛选出特征性谱带, 扩增产物的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性, 物种基因组组成在 RAPD 图谱上也得到了体现^[8-10]。

1.2 RAPD 技术在鱼类种质鉴定中的应用

RAPD 分析可以在 DNA 水平上提供大量的遗传标记, 鉴定快速准确。利用 RAPD 分子标记技术筛选鱼类种间鉴别标记, 为鱼类的分子标记辅助选育、种质资源保护和遗传性状选育提供技术支撑。

夏德全等^[11]检测了奥利亚罗非鱼养殖群体与湘湖、美国及沙市三个尼罗罗非鱼养殖群体的 RAPD 标记的变异情况, 得到了 4 个特异性 RAPD 标记, 可以作为奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的分子标记。梁利群等^[12]用 84 个随机引物扩增出黑龙江野鲤 (*Cyprinus carpio haemalopterus Temmincket et Schlegel*) 的特有片段 233 个, 柏氏鲤 (*Cyprinus pellegrini pellegrini Tchang*) 特有片段 225 个, 这些特异片段均可作为黑龙江野鲤和柏氏鲤的分子遗传标记。姚纪花等对于方正、彭泽和淇河 3 个地区的银鲫进行了 RAPD 检测, 结果显示 3 个引物对 3 种群银鲫扩增出的指纹图谱差异显著, 可作为银鲫种群鉴定的分子标记。陈超等^[13]利用 RAPD 技术对红鳍东方鲀、假睛东方鲀、暗纹东方鲀和从日本引进的红鳍东方鲀 4 个种进行了遗传标记鉴别研究。在事先优化的条件下, 20 个随机引物扩增出 77 条有其特异性扩增图谱, 可作为种鉴定的依据。

杨弘等^[14]利用 RAPD 技术对日本鳗 (*Anguilla japonicus*)、欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 和美洲鳗 (*Anguilla rostrata*) 的 DNA 进行扩增, 共扩增出 37 个特异性标记, 可用来区分这 3 种鳗鱼。佟雪红等^[15]利用 RAPD 技术对建鲤、黄河鲤及其正反杂交子代共 4 个群体 RAPD 扩增图谱的比较, 寻找两亲本的 RAPD 特征标记, 探讨子代杂种优势产生的分子生物学机理, 为下阶段良种培育提供遗传学依据。司伟等^[16]运用 RAPD 技术对建鲤人工诱导雌核发育的子一代进行分析, 区分雌核发育鱼与杂交鱼, 以建立雌核发育鱼的分子鉴别技术。

1.3 RAPD 技术的特点

RAPD 技术的最大优点在于实验操作不需克隆制备、同位素标记、杂交等繁琐的步骤, 具有操作简单、分析速度快、所需样品量少、易检测等特点。RAPD 一般表现为显性遗传, 可以对整个基因组 DNA 进行多态检测。

RAPD 技术较易受到各种因素的影响, 图谱中某些弱带重复性较差、稳定性差, 而且目前该法在引物长度和序列及应用的引物数目、扩增反应条件等实验技术方面未标准化, 影响了不同条件下结果的可比性。此外, 每个标记含有的信息量小, 可能出现假阳性或假阴性结果和显性标记, 无法区分从一个位点扩增的

DNA片段是纯合的还是杂合的,无法进行等位基因分析。这就要求:(1)操作规范,反应体系的组成需要力求一致,尽可能地使RAPD反应标准化;(2)提高扩增片段的分辨率;(3)将RAPD标记转化为SCAR标记后再进行常规的PCR分析,可以提高反应的稳定性及可靠性。

2 SCAR标记技术在鱼类种质鉴定中的应用

2.1 SCAR标记的提出

Paran和Mihcelmore建立了一种相对可靠、稳定、可长期利用的RAPD标记技术,即序列特定扩增区域标记(Sequence characterized applied region),简称SCAR标记^[6]。SCAR标记是以PCR技术为基础的,且为遗传上单一的特定位置点,其也可能包含扩增区域的高拷贝或散布的基因组序列。SCAR标记的具体建立程序为:先用随机引物对基因组DNA进行RAPD扩增,筛选特异片段,获取特异的RAPD标记,然后进行克隆和测序,以测序一端10~20 bp加以RAPD引物的10 bp为模板合成一对引物,以此引物再进行PCR扩增分析。

SCAR标记技术是基于RAPD技术建立起来,优越性体现在:(1)由于使用较长引物序列和较高的退火温度,重复性较好;(2)可将显性的RAPD标记转化为共显性的SCAR标记;(3)可排除电泳过程中EB对PCR产物的直接污染。因此,SCAR标记技术已经成为转化RAPD的一种稳定可行的方法^[17-19]。

2.2 SCAR(Sequence characterized applied region)标记的应用

由于SCAR标记克服了RAPD重复性欠佳的弱点,可以提高基因定位和分子作图的效率,在国外已广泛的应用于分子标记辅助育种、种质资源鉴别、构建遗传图谱、遗传多样性分析、亲缘关系分析及与疾病相关基因的QTLs定位等方面。

Debeber等^[20]利用SSR、AFLP、RFLP、SCAR复合分子标记构建了玫瑰花的遗传图谱,并且标记出与玫瑰黑斑相关联的抗性基因。M. Iruela等^[21]利用RAPD和SCAR复合分子标记鉴定了与鹰嘴豆枯萎病相关QTLs,两个QTLs(LG4a、LG4b)是位于两个连锁群中。S.D.Basha、M.Sujatha^[22]利用RAPD、ISSR、SCAR标记技术分析麻枫树种群间和种群内的遗传多样性。Laetitia Mahe等^[23]利用SCAR等多种分子标记分析了咖啡抗叶锈病基因。Sirawut Klinbunga等^[24]不同品系青梭子蟹的基因组作PCR-SSCP分析,并转化为SCAR标记,为分析不同品系青梭子蟹的亲缘关系提供可靠的方法。Hongyan Su等^[25]首次利用SCAR标记

鉴定灵芝菌种,一对引物GL612F、GL612R扩增612 bp DNA片段。

作为一种重要的分子标记辅助育种技术,中国学者也成功地将SCAR标记应用于斑马鱼、稀有鲫等重要经济型养殖鱼类良种选育与保存中。高俊生等^[26]以黑龙江鲤、荷包红鲤抗寒品系、荷包红鲤、柏氏鲤以及荷包红鲤抗寒品系(父本)与柏氏鲤(母本)杂交F₂的DNA样品为材料,获得2个与鲤抗寒性状相关的RAPD标记。据测序结果,设计3对SCAR引物,SCAR02L / SCAR02R引物可成功的反映杂交F₂两个群体在抗寒能力上的差异,可用作鲤抗寒基因分子辅助选择的依据。但将RAPD及SCAR复合分子标记成功的应用在鱼类种质鉴定中的报道还很少。

童芳芳等^[27]将得到的RAPD标记与SCAR标记相结合,成功的构建了RAPD-SCAR复合分子标记技术。选用20个随机引物对普通黄颡鱼、光泽黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼三种黄颡鱼进行RAPD扩增,获得特异标志性条带作为RAPD标记;并设计了SCAR引物,扩增检测后证明能对三种黄颡鱼实现准确有效的鉴别。郑伟、徐彦山等^[28]利用童芳芳等构建的RAPD-SCAR复合分子标记技术,测定了东北三省主要分布区的黄颡鱼的RAPD和SCAR图谱,根据RAPD-SCAR复合分子标记确定,所检测的48尾鱼分属于普通黄颡鱼(*Pelteobagrus eupogon*)、瓦氏黄颡鱼(*P. vachelli*)和光泽黄颡鱼(*P. nitidus*)。

高凤英等^[29]应用RAPD技术对3个奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)群体对RAPD分析中获得的6条特异带进行SCAR转化,获得2个SCAR标记,区分3个不同奥利亚罗非鱼群体,并将为今后的选择育种提供分子标记。Zhou等^[30]对5个雌核发育系银鲫的SCAR标记进行了研究,找到了可区分不同雌核发育系的5个SCAR标记。

3 RAPD-SCAR复合分子标记的应用前景

随着分子生物学及其实验技术的发展,动植物遗传育种研究中将更多地采用多种分子标记相结合的辅助育种技术,如RAPD-ISSR^[31-32], RAPD-AFLP^[33], RFLP-SCAR^[34]等,形成动植物育种新的方法和手段,即复合分子遗传标记辅助育种技术。由于RAPD分子标记是用10个碱基的随机引物进行PCR扩增得到的,对反应条件(包括反应体系各组分的相对含量以及循环程序)的变化很敏感,重复性较差。SACR分子标记是根据RAPD分子标记的序列分析结果用20~28个碱基的特异引物进行PCR扩增得到的,SCAR标记克服了RAPD标记的不足,操作简捷,特异性和重复性较

高;可将显性的RAPD标记转化为共显性的SCAR标记。两种分子标记技术相结合使种质鉴定更为快速准确,提高了育种速度,缩短了育种周期,为鱼类遗传育种及相关的研究工作提供了更加准确遗传学依据。

RAPD-SCAR复合分子标记技术受到了育种工作者的广泛重视,在国内外已有在动植物遗传育种中应用的相关研究报道,但在水产动物育种中的应用还很少。当前,优良种质的鉴定和优质经济性状基因的挖掘(包括与抗病^[35]、抗寒^[36]、抗逆有关的数量性状^[37-38]和与产量品质等有关的质量性状^[39-40])相关分子标记研究已成为热点。利用复合分子标记技术鉴定种质,便于摸清优良种质遗传变异背景,明确亲缘关系远近;并且更加清楚的认识优异种质,发掘可利用新基因,为育种提供丰富的遗传材料和科学理论依据。因此,这种方法在水产动物种质鉴定、挖掘优质相关经济性状的分子标记研究中有着广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 郑光明,朱新平,张跃.鱼类种质鉴定技术与渔业管理[J].中国水产科学,1999,(6) 2:108-111.
- [2] 朱健,王建新,龚永生,等.我国鲤鱼遗传改良研究概况[J].浙江海洋学院学报,2000,19(3):266-271.
- [3] 董志国,常玉梅.鱼类种质鉴定的主要技术与方法[J].水产学杂志,2002,15(2):74-77.
- [4] 栾会妮,姚维志,孙志明.分子标记技术在水产育种与种质鉴定中的应用[J].水利渔业,2004,24(4):4-7.
- [5] 董志国,常玉梅.鱼类种质鉴定的主要技术与方法[J].水产学杂志,2002,15(2):74-77.
- [6] N.Agusti,M.C.deVicente,R.Gabarra. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis [J]. Molecular Ecology, (2002)8:1467-1474.
- [7] 权亚茹,张本.RAPD技术在我国鱼类研究中的应用[J].生物学通报.2005,40(2):15-17.
- [8] 王玲玲,宋林生,李红蕾,等.AFLP和RAPD标记技术在栉孔扇贝遗传多样性研究中的应用比较[J].动物学杂志,2003,38(4):35-39.
- [9] 杨英军,李玉红.RAPD的原理及其操作[J].洛阳农业高等专科学校学报.1999,19(3):27-30.
- [10] 林炜,刁丽娟.PAPD技术及其在动物遗传多样性分析中的应用[J].生物学通报.2002,37(3):17-19.
- [11] 夏德全,曹莹,吴婷婷,等.用RAPD分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用[J].水产学报,1999,23(1)27-31.
- [12] 梁利群,孙效文,石连玉,等.不同鲤鱼种间DNA遗传标记多态性[J].中国水产科学,2000,7(2):18-21.
- [13] 陈超,石拓,孙曙光,等.应用RAPD标记对东方鲀属进行种类鉴别及其聚类分析[J].海洋水产研究,2001,22(3):32-36.
- [14] 杨弘,王希道,吴婷婷,等.用RAPD技术研究3种鳊鱼的种质鉴定[J].中国水产科学,2002,9(3):269-272.
- [15] 佟雪红,董在杰,缪为民,等.建鲤与黄河鲤的RAPD分子标记及其杂交优势的遗传分析[J].广东海洋大学学报,2007,27(1):1-6.
- [16] 司伟,傅洪拓,龚永生,等.运用RAPD技术鉴别建鲤雌核发育后代的研究[J].大连水产学院学报,2007,22(2):92-96.
- [17] Mukhlesur Rahman, Peter B. E. McVetty, Genyi Li. Development of SRAP, SNP and Multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in Brassica rapa L[J]. Theor Appl Genet, (2007)115:1101-1107.
- [18] S.K.Gupta,A.Charpe,S.Koul, et al. Development and validation of SCAR markers co-segregating with an Agropyron elongatum derived leaf rust resistance gene Lr24 in wheat [J]. Euphytica, (2006)150: 233-240.
- [19] Van.L.Ripley and Vicky Roslinsky. Identification of an ISSR marker for 2-propenyl glucosinolate content in Brassica juncea L. and conversion to a SCAR marker [J]. Molecular Breeding,2005,16: 57-66.
- [20] Z.Yan, C.Denneboom, T.D ebener, et al. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers [J]. Theor Appl Genet, 2005,110: 766-777.
- [21] M.Iruela,J.Rubio,F.Barro, et al. Detection of two quantitative trait loci for resistance to ascochyta blight in an intra-specific cross of chickpea (*Cicer arietinum* L.): development of SCAR markers associated with resistance [J]. Theor Appl Genet,2006,112:278-287.
- [22] S.D.Basha, M.Sujatha. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas*(L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers[J]. Euphytica, (2007)156:375-386.
- [23] Laetitia Mahe,Marie-Christine Combes, Vitor M. P. Várzea, et al. Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.) [J]. Mol Breeding, 2008,21:105-113.
- [24] Sirawut Klinbunga,Kannika Khetpu,Bavornlak Khamnamtong, et al. Development of a Species-diagnostic SCAR Marker of the Blue Swimming Crab (*Portunus pelagicus*) [J]. Biochem Genet, 2007,45: 755-760.
- [25] Hongyan Su, Lei Wang, Yi Ge, 等. Development of strain-specific SCAR markers for authentication of *Ganoderma lucidum*. World J Microbiol Biotechnol[J]. springer, 2008,24:1223-1226.
- [26] 高俊生,孙效文,梁利群.鲤抗寒性状的RAPD标记转化为SCAR标记的研究[J].大连水产学院学报,2007,22(3):194-197.
- [27] 童芳芳,汤明亮,杨星,等.用RAPD和SCAR复合分子标记对黄颡鱼属进行种质鉴定[J].水生生物学报,2005,29(4):465-468.
- [28] 郑伟,徐彦山,王秀兰,等.应用RAPD和SCAR复合分子标志鉴定东北黄颡鱼[J].水利渔业,2007,27(3):11-12.
- [29] 高风英,叶星,卢迈新,等.3个奥利亚罗非鱼群体遗传多样性的RAPD分析和SCAR标记的转化[J].上海水产大学学报,2008,17(1):22-27.
- [30] Li Zhou, Yang Wang, Jian-Fang Gui. Molecular analysis of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) clones by SCAR markers [J]. Aquaculture, 2001,201:219-228
- [31] Binh Thanh Thai, B.Christopher, P. Burridge, et al. Genetic

- diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci [J]. *Aquaculture*, 2007,269:174-186.
- [32] Richárd Bártfai, Sándor Egedib, Gen Hua Yuea, et al. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2003,219:157-167.
- [33] M.S.Negi,M.Devic,M.Delseny, et al. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2000,10:146-152.
- [34] E.Julio A, J-L.Verrier A, F.Dorlhac de Borne. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L *Theor Appl Genet*, 2006,112: 335-346.
- [35] ADINOLFI Barbara, CHICCA Andrea, MARTINOTTI ° Enrica, et al. Sequence characterized amplified region (SCAR) analysis on DNA from the three medicinal Echinacea species [J]. *Fitoterapia*, 2007,78:43-45.
- [36] Barman H K, Barat A, Yadav B M, et al. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay [J]. *Aquaculture*, 2003, 217:115-123.
- [37] Z.Y.Piao, Y.Q.Deng, SR Choi, et al. SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) [J]. *Theor Appl Genet*, 2004,108:1458-1465.
- [38] Y.H.Lu. Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana Wallr.*) in sunflower [J]. *Theor Appl Genet*, 2000,100:625-632.
- [39] Cristian Araneda, Roberto Neira, Patricia Iturra. Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Aquaculture*, 2005,247:67-73.
- [40] F.J.Noguera A, J.Capel A, J.I.Alvarez A, R.Lozano. Development and mapping of a codominant SCAR marker linked to the andromonoecious gene of melon [J]. *Theor Appl Genet*, 2005,110: 714-720.