

研究简报

斑鳅种内遗传多态性以及翘嘴鳅的分子鉴别

杨 星¹ 杨军峰¹ 汤明亮¹ 彭 智² 赵兴高³ 曾可为⁴ 蔡焰直⁵
邵雪玲¹ 刘思阳¹

(1. 武汉大学发育生物学教育部重点实验室, 生命科学学院, 武汉 430072; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 3. 湖北宜都清江渔业
有限公司, 宜昌 443000; 4. 武汉市水产科学研究所, 武汉 430065; 5. 湖北新兴水产研究开发有限公司, 武汉 430071)

INTRASPECIFIC GENETIC POLYMORPHISMS OF *SINIPERCA SCHERZERI* STEINDACHER
AND MOLECULAR IDENTIFICATION WITH *SINIPERCA CHUATSI*

YANG Xing¹, YANG Jun-Feng¹, TANG Ming-Liang¹, PENG Zhi², ZHAO Xing-Gao³, ZENG Ke-Wei⁴, CAI Yan-Zhi⁵,
SHAO Xue-Ling¹ and LIU Si-Yang¹

(1. Key Laboratory of Development Biology in Education Department, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072; 2. Fisheries College, Huazhong
Agricultural University, Wuhan 430070; 3. Hubei Yidu Qingjiang Fish Industries Co. Ltd, Yichang 443000; 4. Wuhan Fisheries Research Institute, Wuhan
430065; 5. Hubei Xingxing Fisheries Research Development Co. Ltd, Wuhan 430071)

关键词: 斑鳅; 翘嘴鳅; RAPD; 遗传相似度; 遗传距离

Key words: *Siniperca scherzeri* Steindacher; *Siniperca chuatsi*; RAPD; Genetic similarity; Genetic distance

中图分类号: Q346+.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)06-0891-05

鳅鱼属鲈形目、酯科、酯亚科, 种类繁多。有长体鳅、波纹鳅、斑鳅、无斑鳅、暗鳅、大眼鳅、翘嘴鳅等, 是淡水鱼类中的名贵鱼类^[1], 肉质纯白细嫩, 味道鲜美可口。对其报道多集中在水产养殖方面, 而从遗传学和 DNA 角度进行分析的报道较少, 本文用 RAPD 技术对斑鳅 (*Siniperca scherzeri* Steindacher) 和翘嘴鳅 (*Siniperca chuatsi*) 进行了鉴别并分析其遗传多态性。另外, 我们采用斑鳅作母本、翘嘴鳅作父本进行交配, 获得了杂交 F1 代即杂交鳅, 其生活力和某些性状较其亲本有一定的提高。同时通过 RAPD 分析发现了杂交子代的遗传图谱的变化特点。

随机扩增多态 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是建立在 PCR 技术基础上的检测基因组 DNA 多态性和建立分子遗传标记的技术。有检测灵敏方便、多态性强等特点^[2,3], 在生物的遗传多样性、群体遗传学、分类学及农牧业的遗传育种等研究中有广泛的应用, 尤其常见于属种间分子鉴定及杂种的遗传分析^[4,5]。本实验旨在通过 RAPD 技术对斑鳅和翘嘴鳅进行遗传变异及其分化的研究, 为种质资源

研究、人工养殖及品种培育提供相关的遗传背景资料 and 理论依据, 为分子标记辅助育种打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 13 尾斑鳅、6 尾翘嘴鳅和 6 尾杂交鳅均由武汉市水产研究所提供。

1.2 DNA 提取 参考 Frederick M. Ausubel 方法进行^[6]。

1.3 DNA 体外扩增 (PCR) PCR 的反应为 25 μ L 体系。三蒸水: 18 μ L; Buffer: 2.5 μ L; 100 mmol/L 的 dNTPs 0.5 μ L; 25 mmol/L 的 Mg²⁺ 2 μ L; 5 U/ μ L Taq polymerase 0.1 μ L; Template 50 ng; Primer 1 μ L (本体系的引物使用浓度是 1OD 的引物, 加入 300 μ L 的三蒸水, 取 1 μ L)。阴性对照是不加模板 DNA, 于反应混合液上加 10 μ L 的矿物油。反应参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 然后在 94 $^{\circ}$ C 45s, 36 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 反应循环 38 次; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

1.4 数据处理 把电泳图谱中任何一个个体在任意泳道垂直方向显示的带纹记做“1”, 而其他个体对应的位点缺少此带则

收稿日期: 2005-12-09; 修订日期: 2007-01-25

基金项目: 湖北省科技攻关计划项目 (2004AA205B02); 武汉大学科技创新基金项目资助

作者简介: 杨星 (1982—), 男, 湖北赤壁市人; 硕士研究生; 从事鱼类遗传多样性研究。杨军锋对论文同等贡献

通讯作者: 刘思阳, E-mail: sy_liu@whu.edu.cn

记做“0”,这样可以得到各个体的二进制数据信息的方阵。

1.5 种内遗传距离的获得 将上述二进制数据方阵用 Phyl-Tools 软件计算获得个体间遗传距离矩阵;根据 Nei 公式计算任意斑鳊的遗传相似度 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 以及遗传距离 $D = 1 - S^{[7]}$ 。

2 结果

2.1 斑鳊、翘嘴鳊和杂交鳊的 RAPD 图谱鉴定

选用 20 个随机引物对斑鳊、翘嘴鳊和杂交鳊的群体进行 RAPD 分析,引物及其扩增的情况(表 1)。

表 1 20 个引物序列及扩增情况

Tab.1 20 primers and the result of amplification

引物编号 No. of primer	引物序列 Sequence of primer	扩增带数 Bands of amplification	引物编号 No. of primer	引物序列 Sequence of primer	扩增带数 Bands of amplification
S1	TTCCAGCCAG	6	S11	AAAGCTGCGG	6
S2	GTGAGCGTC	8	S12	TGTCATCCCC	5
S3	GGGGGTCTTT	9	S13	AAGCCTCGTC	7
S4	CCGCATCTAC	11	S14	TGCGTGCTTG	8
S5	GATGACCGCC	8	S15	GACGGATCAG	9
S6	GAACGGA CTC	5	S16	CACACTCCAG	8
S7	GTCCCCACGA	11	S17	TTCCCCCAG	4
S8	TGGACCGGTG	6	S18	TGAGTGGGTG	5
S9	CTCACCGTCC	5	S19	GTTGCCAGCC	6
S10	TCTCTGGGTC	5	S20	ACTTCGCCAC	5

表 1 中任意一引物对应的扩增带纹数是指扩增的多态位点的并集。因此,表 1 中的扩增带数并不能反映出各个种群的差异,仅能反映出带谱的丰度。要真正鉴别其品种用“带谱组合法”,就是将图谱上具有特征性标出带型,如果某

物种享有某一特征带则记为“+”,无此带则记为“-”,这样就可以得到不同的“正负组合”,从而将不同的物种从带谱上进行了区分。如图 1:

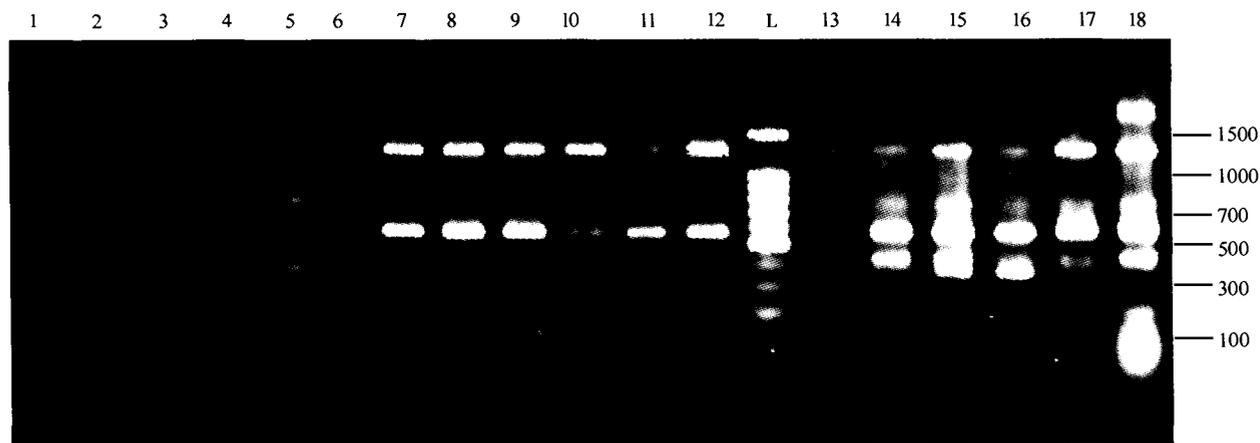


图 1 引物 S14 对斑鳊、翘嘴鳊和杂交鳊 18 个个体的 RAPD 图谱

Fig.1 RAPD patterns amplified by primer 14 for the 18 individuals of *Siniperca scherzeri* Steindacher, *Siniperca chuatsi* and half-bred mandarin fish 编号从左到右,依次为斑鳊(1—6)、翘嘴鳊(7—12)、100bp DNA Ladder(L)、杂交鳊(13—18)

From left to right, *Siniperca scherzeri* Steindacher (1—6), *Siniperca chuatsi* (7—12), 100bp DNA Ladder(L), half-bred mandarin fish(13—18)

由表 2 可以看出,杂交鳊、翘嘴鳊和斑鳊“正负组合”中,没有任何两个组合是相同的,这意味着没有任何两个种是相同的,从而清楚地鉴别出两个种和杂交种。因此引物 S14 对

于杂交鳊、翘嘴鳊和斑鳊的鉴定是一个非常适合的引物,另外,其他能够较好地鉴定 2 个种及其杂交种引物的还有 S3、S4、S9、S13、S15、S16 等,如表 3:

表 2 引物 S14 对斑鳊、翘嘴鳊和杂交鳊的“带谱组合”分析

Tab.2 Patterns combination of *Siniperca scherzeri* Steindacher, *Siniperca chuatsi* and half-bred *Siniperca* by primer S14

	S14-1300	S14-710	S14-550	S14-350
斑鳊 <i>Siniperca scherzeri</i> Steindache	-	+	-	+
翘嘴鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	+	-	+	-
杂交鳊 Hybridization	+	+	+	+

表 3 引物 S3、S4、S9、S13、S15 和 S16 对斑鳊、翘嘴鳊和杂交鳊的鉴定

Tab.3 The identification of *Siniperca scherzeri* Steindacher, *Siniperca chuatsi* and half-bred *Siniperca* by primers S3, S4, S9, S13, S15 and S16

引物编号 No. of primer	扩增总带数 Number of amplification	扩增特异片段长度 Length of amplification(bp)	斑鳊 <i>Siniperca scherzeri</i> Steindacher	翘嘴鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	杂交鳊 Hybridization
S3	3—5	500	-	-	+
		450	+	-	-
		300	-	+	+
S4	3—5	650	+	-	+
		564	+	-	-
S9	2—4	940	+	-	+
		650	+	-	-
S13	3—5	1000	-	+	+
		680	+	-	+
S15	1—4	400	+	-	+
		300	+	+	-
S16	4—5	720	+	-	+
		550	-	+	+

2.2 斑鳊的种内变异分析

经电泳检测分析筛选,发现 5 个引物对斑鳊的种内

RAPD 产生了稳定的多态性,分别是 S2、S7、S9、S13 和 S20(表 4)。以 S13 为例其电泳结果(如图 2):

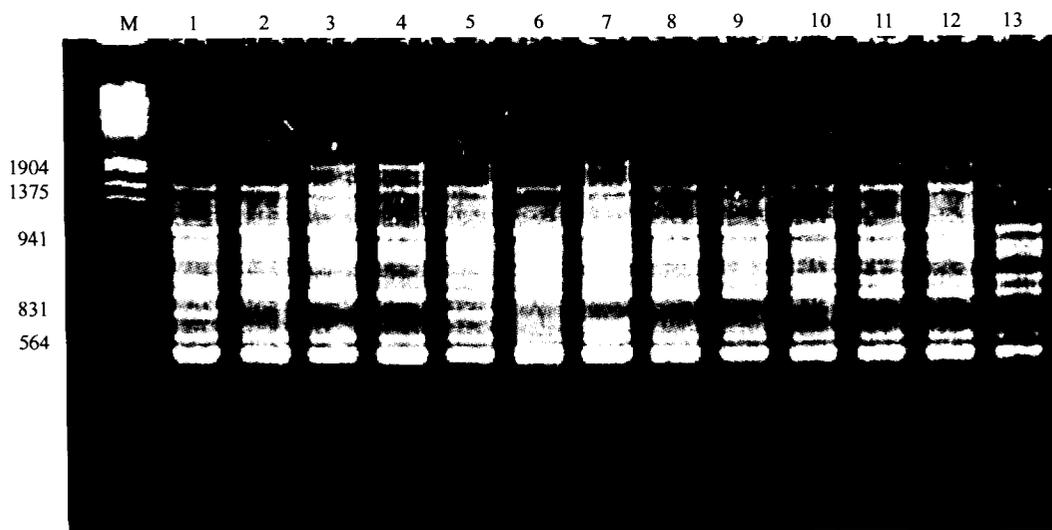


图 2 引物 S13 对斑鳊 13 个个体的 RAPD 图谱

Fig.2 RAPD patterns amplified by primer S13 for the 13 individuals of *Siniperca scherzeri* Steindacher

表 4 5 种引物对斑鳅个体的扩增情况

Tab.4 The amplification about *Siniperca scherzeri* Steindacher by 5 primers

引物 Primer	不同个体扩增带数 Band of amplification												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S2	1	2	3	1	1	2	1	3	2	3	4	2	2
S7	3	3	4	4	2	3	6	6	6	5	4	8	5
S9	4	4	3	4	4	3	4	4	2	4	4	4	4
S13	8	8	8	7	7	7	7	7	9	8	8	7	8
S20	4	4	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	3

注:1—13 为个体编号 Note:1—13 are the numbers of individual

表 5 用 RAPDDIST 软件计算出的斑鳅 13 个个体间的遗传距离

Tab.5 Genetic distances among 13 individuals of *Siniperca scherzeri* Steindacher counted (X) by RAPDDIST

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	0.9756											
3	0.9048	0.9302										
4	0.9500	0.9268	0.9048									
5	0.9246	0.9000	0.8293	0.9231								
6	0.9246	0.9500	0.9268	0.9231	0.8947							
7	0.8372	0.8636	0.8444	0.9302	0.9048	0.8571						
8	0.8091	0.8889	0.8261	0.9091	0.8372	0.8837	0.9778					
9	0.8372	0.8182	0.8889	0.8372	0.7019	0.8571	0.8696	0.8936				
10	0.9091	0.9333	0.9130	0.9091	0.8372	0.8837	0.8979	0.9583	0.8936			
11	0.9091	0.9333	0.9565	0.9092	0.8372	0.8837	0.8511	0.9166	0.8511	0.9583		
12	0.8000	0.8696	0.8511	0.8889	0.8182	0.8636	0.9167	0.9388	0.8500	0.9778	0.8571	
13	0.9048	0.9302	0.9091	0.9048	0.8293	0.8780	0.8889	0.9130	0.8889	0.9565	0.9565	0.8936

由表 5 计算出斑鳅种内的平均相似度 S 为 0.8909, 变异平均值 V 为 0.1091。

3 讨论

3.1 斑鳅、翘嘴鳅和杂交鳅的遗传鉴定

种质资源的鉴定是一项非常基础性的工作,对探明物种和遗传资源有重要意义。斑鳅、翘嘴鳅及其子一代杂交鳅在形态上很相似,种间鉴别比较困难。即使是同一个种也会存在种内变异,用形态学特征作为鉴别依据在有些情况下并不可靠^[8],用同工酶方法则易受到自然选择的影响^[9]。但是,利用具有重复性和非编码 DNA 的标记如 RAPD 标记则很少受到自然选择的限制,其较高的多态性增加了种内和种间鉴定的可行性^[10,11]。本文采用 RAPD 方法对斑鳅、翘嘴鳅和杂交鳅进行了鉴定,获得可分别将其区别开来的 7 个引物。各个引物的扩增情况不一样,有的情况是三个种在同一引物下有各自的特异标志带,但大多数情况没有这样理想,往往是几个种享有同一片段,在这种情况下采用“带谱组合法”会很容易地将它们区别开来,这个方法的优点是,即使在鉴别多个种和缺乏典型标记的情况下仍然适用。

同时本文选择斑鳅和翘嘴鳅进行人工杂交并分析杂交

鳅的基因图谱变化,根据带型可以看出其变化的 3 种模式:共显(表现为子代图谱是父、母本图谱叠加的结果,即亲代的图谱完全被子代所继承)、共显—变异(这种图谱同样具有叠加性,但是亲本中的某些带在子代中出现了变异情况)和共显—弱化(这种图谱一方面表现为叠加,另一方面又有一些片段出现弱化)。以上 3 种方式并不代表全部,随着引物的增多,可能还会发现其他方式。但总的来说,杂交 F1 图谱基本上呈共显性遗传。一方面子代表现出对亲本的继承性,另一方面子代的基因杂合度也明显增强,直观地表现为带谱丰度的增加,这预示着杂交优势的可能性^[12]。

3.2 斑鳅种内遗传多样性分析

遗传多样性的研究是生物多样性研究的重要内容,只有通过遗传多样性的研究才能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化^[13-15],本实验中直观地表现为 DNA 带谱的多态性。在对斑鳅种内多态性分析中发现种内遗传相似度高达 89.09%,在自然环境下这是一个很高的遗传相似度。其种内居群的个体相似率情形与罗非鱼应当具有可比性,而罗非鱼种内个体间相似率分别是 0.73 ± 0.15 (尼罗罗非鱼)、 0.78 ± 0.12 (莫桑比克罗非鱼)和 0.87 ± 0.07 (奥利亚罗非鱼),种群内的相似率比鲮鱼的要低^[16]。造成这种原因一方

面可能是人工养殖的斑鳊,接受的是人工选择,在养殖过程中,人们为获取高产量和高品质的鳊鱼而经常筛选个体,从而会使某些基因从该基因库中流失。另外,由于养殖群体近亲交配机率大,近亲交配和人工选择这两种压力使得斑鳊的基因型变得单一,因而在电泳图谱上呈现了较多的相似带型。人工选择和近亲繁殖会造成遗传多样性下降,鱼类遗传多样性的降低或被破坏会给渔业生产带来损失。鱼类遗传多样性是改良鱼类品种和提高鱼类品质的物质基础。应用生物遗传多样性的原理与方法改良或提高渔业产量是水产学工作者的主要任务。深入开展这一研究,会对鱼类资源保护、遗传育种产生积极的意义。

参考文献:

- [1] Si Y D, Chen Y H, Zeng J C. The oxygen consumption and cultivation of Mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 1995, 19: 327—331 [司亚东, 陈英鸿, 曾继参. 鳊鱼的耗氧率及其池塘养殖. 水生生物学报, 1995, 19: 327—331]
- [2] Qiu F, Fu J M, Jin D M, et al. The Molecular detection of genetic diversity [J]. *Chinese Biodiversity*, 1998, 6(2): 143—150 [邱芳, 伏健民, 金德敏, 等. 遗传多样性的分子检测. 生物多样性, 1998, 6(2): 143—150]
- [3] Li J Z, Liu S J, Liu Y, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic Diversity of the allotetraploid crucian-carp population [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2005, 29(1): 97—100 [李建中, 刘少军, 刘筠, 等. 异源四倍体鲫鲤群体遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2005, 29(1): 97—100]
- [4] Zhao W X, Yang X, Liu S Y. Molecular identification of the four species of the genus *Pseudobagrus* and the genetic analysis of hybrid [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, (in press). [赵文学, 杨星, 刘思阳. 黄颡鱼属种间分子标记及其杂交遗传方式分析. 水生生物学报, (待发)]
- [5] Tong F F, Tang M L, Liu S Y, et al. Species authentication of *Pelteobagrus* by multiplex molecular marker RAPD and SCAR [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2005, 29: 465—468 [童芳芳, 汤明亮, 刘思阳, 等. 用 RAPD 和 SCAR 复合分子标记对黄颡鱼属进行种质鉴定. 水生生物学报, 2005, 29: 465—468]
- [6] Ausubel F, et al. Short protocols in molecular biology (3rd ed) [M]. Beijing: Science Press, 1998, 35—36
- [7] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol. Biol. Evol*, 1990, 7: 478—484
- [8] Briolay J, et al. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, 9: 100—108
- [9] Caccone A, et al. Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays [J]. *Journal of Heredity*, 1997, 88: 316—324
- [10] Williams J K G, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531—6535
- [11] Haymer D, et al. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction [J]. *Genome*, 1994, 37: 244—248
- [12] Dong Z J, Xia D Q, Wang T, et al. Application of RAPD technique in a study of fish heterosis [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(1): 37—40 [董在杰, 夏德全, 王涛, 等. RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用. 中国水产科学, 1999, 6(1): 37—40]
- [13] Luo S L, et al. Inheritance of RAPD markers in an interspecific F1 hybrid of grape between *Vitis quinquangularis* and *V. vinifera*, *Scientia Horticulture*, 2002, 93: 19—28
- [14] Ayliffe M A, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22(9): 1632—1636
- [15] Liu C, Chen Y, Gui M, et al. Studies on the mechanism of variations of hybrids of domesticated silkworm and Eri silkworm-RAPD analysis of genome [J]. *Hereditas*, 1998, 20(2): 5—8
- [16] Mital D P, Teoh E K. An automated matching technique for fingerprint identification [A]. IEEE international conference on knowledge-based intelligent electronic systems, proceedings (1) [C]. USA: IEEE. 1997, 142—147