

翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker) 种群遗传多样性的 RAPD 分析*

张永正¹ 张海琪² 邵庆均³ 何中央²

(1. 浙江海洋学院 杭州 311258; 2. 浙江省水产技术推广总站 杭州 310012;
3. 浙江大学动物科学学院 杭州 310007)

提要 采用 RAPD 技术对翘嘴红 养殖群体进行了 DNA 多态性检测。共采用 40 个随机引物进行扩增, 其中 14 个引物可获得清晰且重复性好的扩增图谱, 共扩增出 121 个 RAPD 位点, 具有多态现象的位点为 40 个, 多态位点比例为 33.06%。翘嘴红 群体的遗传相似系数为 0.8878—0.9600, 平均为 0.9201, 遗传变异度为 0.0799。Shannon 多样性指数为 10.8824, Shannon 多样性值为 0.0899。研究表明, 翘嘴红 目前的种质资源状况令人堪忧, 改变目前人工繁育模式, 建立原种、良种场, 丰富物种遗传多样性是资源保护的基础。

关键词 翘嘴红, 遗传多样性, RAPD
中图分类号 Q78

翘嘴红 (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker) 俗称白条、大白鱼等, 在分类上属鲤形目、鲤科、亚科、红 属, 分布极广, 是东南亚特有的一个类群, 绝大多数属种产于中国, 在我国的内陆水域如辽河、长江、珠江流域等地较多。翘嘴红 因生长快、肉味鲜美, 氨基酸含量高而备受青睐(李代淑等, 1991; 尹洪滨等, 2003), 现已成为新的名特优水产养殖项目。国内学者对翘嘴红 的研究, 主要侧重于生长、池塘养殖、鱼病防治、营养成分、饲料研究等方面(赵吉伟等, 2000, 2001; 郭水荣等, 2003; 黄权等, 2003; 邵力等, 1990; 王桂芹等, 2004), 这些研究成果无疑对其生产和开发起到重要的指导作用。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 是目前易于建立、较行之有效的—种鉴定核 DNA 基因型的技术, 具有灵敏、快速、成本低等优点, 可对核 DNA 进行大量“扫描”式分析, 是进行群体遗传多样性分析的重要方法之一。现代遗传学观点认为, 一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件(Conrad, 1983)。因此, 研究物种的遗传结构和遗传分化,

揭示其遗传多样性水平是生物资源恢复和持续利用的前提和基础。因此, 查明翘嘴红 的遗传背景, 正确地评定翘嘴红 的遗传多样性十分必要。本文中作者采用随机扩增多态 DNA(RAPD) 技术对翘嘴红 DNA 多态性进行了研究, 以期翘嘴红 的研究积累资料, 并为进一步研究翘嘴红 遗传特异性、种质鉴别、生物进化等提供一定的理论依据, 为人工选种和定向育种提供遗传学指标。

1 材料与方法

1.1 材料

翘嘴红 (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker) 个体均于 2004 年 12 月从杭州农都水产批发市场购买(来源钱塘江水系), 体重 160.5—183.8g, 体长 25.8—27.3cm, 所有活体经塑料袋充氧运回实验室, 经形态学测量后, 取肌肉置于 1.5ml 离心管中, 编号后直接放入超低温冰箱于 -70 保存至分析。

1.2 RAPD 分析方法

1.2.1 总 DNA 提取 约 0.1g 肌肉组织样品经匀浆后, 悬浮于 500 μ l 细胞裂解液(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl,

* 浙江省财政重点资助项目“翘嘴红 优质苗种繁育及健康高效养成技术示范与推广”, 2004—2006; 浙江省科技厅重大攻关项目, 2004C12025 号。张永正, 硕士, 副教授, E-mail: zyz36@163.com

收稿日期: 2007-03-22, 收修改稿日期: 2007-09-29

35mmol/L SDS, pH 8.0), 按蛋白酶 K/酚/氯仿抽提法制备总 DNA。

1.2.2 DNA 检测 以 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的完整性。使用紫外分光光度计将提取的 8 μ l 模板 DNA 稀释 10 倍至 80 μ l 进行测定, 在 260nm 时读数用于计算样品中的核酸浓度, 并计算 A_{260}/A_{280} 的比值, 以估计所提 DNA 的纯度, 最后将 DNA 原液稀释至 25ng/ μ l 于 -20 保存备用。

1.2.3 RAPD 扩增 从 40 个随机引物中筛选出 14 个能稳定扩增出清晰条带的引物(引物 S11 和 S124 的扩增图谱具有典型性, 如图 1 所示), 并利用筛选引物进行群体的 RAPD 分析。RAPD 反应总体积为 25 μ l, 含 2.5 μ l 10 \times PCR 反应缓冲液, 25ng 基因组 DNA, 2.5mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L dNTPs, 1 μ mol/L 引物, 1U *Taq* DNA 聚合酶, 用灭菌双蒸馏 H₂O 补足体积。扩增程序为 94 预变性 3min, 94 变性 45s, 36 复性 45s, 72 延伸 90s, 45 个循环, 最后 72 延伸 7min。RAPD 反应结束后于 4 保存。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离, 电压为 3—4V/cm, 时间约 3h。电泳结束后用 Quantity EQ 型生物凝胶成像仪进行凝胶观察, 照像。

1.3 数据分析

将每个条带看作一个位点, 统计位点总数和多态位点数; 只记录那些电泳后条带清晰的 RAPD 标记。当某一扩增带存在时计为 1, 不存在时计为 0, 据此统计将所有个体的 RAPD 类型转换成二元数据矩阵。

多态位点比例 P , $P = (k/n) \times 100\%$, 其中 k 为多态位点数, n 为所测定位点的总数; 多态位点频率 $f =$ 具有该位点的样本数/总样本数;

样品个体间相似系数 $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$; 遗传变异度 $D = 1 - F$; 其中 N_{xy} 为 x 、 y 个体共同拥有的 RAPD 带数, N_x 、 N_y 分别为 x 、 y 个体各自拥有的 RAPD 带数;

香农多样性指数(Shannon Weveis index of phenotypic diversity) H_o , $H_o = - \sum \pi_i \ln \pi_i$, 其中 π_i 为某一位点在某一群体中出现的频率, \ln 为自然对数; Shannon 多样性值 $H = H_o/N$, N 为此群体检测到的位点总数。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

RAPD 标记符合孟德尔遗传规律, 但由于其为共显性遗传标记, 不能区分显性纯合体和杂合体, 所以常以一个扩增产物片段作为一个位点进行分析。利用 40 条随机引物进行预扩增检测, 发现其中 26 条随机引物的扩增效果不理想, 其余 14 条引物则能获得稳定、清晰、重复性好的扩增带, 可用于进一步的 RAPD 分析(表 1)。14 个引物共检测出 121 个位点, 每个引物扩增出的平均条带数为 8.6, 说明检测的位点还是比较多的。

2.2 多态位点比例

在所检测的 121 个位点中, 具有多态现象的位点为 40 个, 多态位点比例为 33.06%。各位点的基因频率列于表 2。

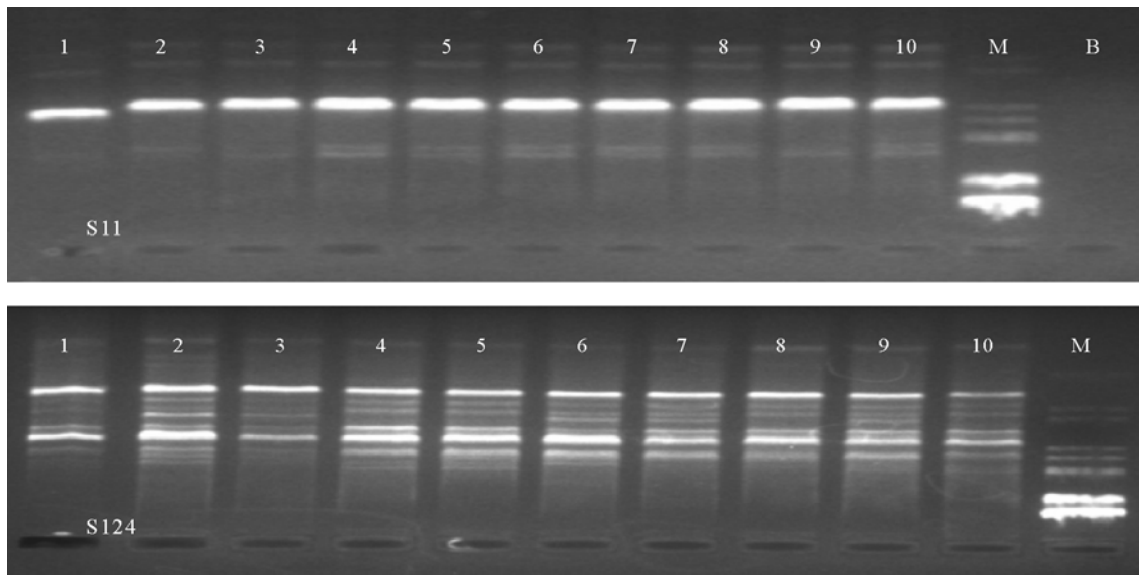


图 1 引物 S11 和 S124 的扩增结果

Fig.1 The RAPD results of primer S11 and S124

表 1 用于翘嘴红鲌遗传多样性分析的随机引物及其序列

Tab.1 RAPD primers and their sequences for the genetic diversity in *E. ilishaeformis*

引物	序列(5—3)	引物	序列(5—3)
S11	GTAGACCCGT	S405	GGGAACGTGT
S119	CTGACCAGCC	S406	CTGGGCAACT
S122	GAGGATCCCT	S407	CCGTGACTCA
S124	GGTGATCAGG	S409	GTCTTGCGGA
S126	GGGAATTCGG	S412	GGGACGTTGG
S129	CCAAGCTTCC	S415	GACCTACCAC
S130	GGAAGCTTGG	S416	GTAACCAGCC

表 2 多态位点频率

Tab.2 The frequency of polymorphic loci

多态位点	多态位点频率	多态位点	多态位点频率	多态位点	多态位点频率
S11-7	0.40	S124-8	0.50	S407-9	0.50
S119-6	0.60	S124-12	0.40	S407-11	0.40
S119-7	0.50	S124-13	0.50	S409-2	0.70
S119-9	0.60	S126-1	0.30	S409-3	0.80
S122-3	0.40	S126-5	0.90	S409-5	0.30
S122-4	0.70	S130-1	0.80	S409-7	0.80
S122-5	0.80	S130-7	0.30	S412-4	0.90
S122-7	0.90	S405-3	0.10	S412-5	0.90
S122-8	0.20	S405-4	0.90	S415-2	0.20
S122-9	0.30	S406-7	0.60	S415-3	0.80
S122-10	0.10	S407-3	0.70	S415-5	0.20
S124-2	0.10	S407-5	0.70	S415-7	0.20
S124-3	0.10	S407-6	0.10	S416-6	0.30
S124-4	0.10				

2.3 遗传相似系数与遗传变异度

根据上述的计算公式分别计算出个体间的遗传相似系数和遗传变异度。翘嘴红群体的遗传相似系数为 0.8878—0.9600, 平均为 0.9201, 遗传变异度为 0.0799。

2.4 Shannon 多样性指数和 Shannon 多样性值

根据上述公式得出: 翘嘴红的 Shannon 多样性指数为 10.8824, Shannon 多样性值为 0.0899。

3 讨论

3.1 翘嘴红鲌遗传多样性评价

Bielawski 等(1996)用 RAPD 技术研究了大西洋沿岸条纹鲈(*Moron saxatilis*)不同种群遗传结构, 在可分析的引物中, 75%的引物为单态引物,

并指出大西洋沿岸条纹鲈核基因组遗传变异较低。作者研究结果显示, 多态引物占总引物(指带比较稳定的引物)的 35%, 说明该种群的翘嘴红

核基因组存在一定水平的遗传变异。就多态位点来说, 脊椎动物遗传多样性的多态位点比例平均值为 24.7%, 研究发现翘嘴红的多态位点比例为 33.06%, 高于脊椎动物的平均值。

权洁霞等(2001)用 RAPD 技术研究人工养殖和野生梭鱼的遗传多样性表明, 养殖群体的 H_o 为 0.2124, 自然种群的 H_o 为 0.2271, 得出梭鱼遗传多样性比较丰富的结论; 宋平等(2001)对黄颡鱼 RAPD 标记及遗传多样性进行了研究, A 和 B 两种群的 H_o 分别是 0.0639 和 0.0465, 本研究得

出翘嘴红的 H_o 与其相近; 张四明等(2000)研究中华鲟的遗传多样性 RAPD 结果表明, 中华鲟的 H_o 为 0.0334, 得出中华鲟遗传多样性比较低的结论。翘嘴红的 H_o 为 0.0799, 由此说明翘嘴红的遗传多样性水平比较低。

3.2 翘嘴红鲌种质资源保护

由于“瓶颈”效应, 人工繁育对养殖群体的遗传多样性影响早已有报道(Maria *et al*, 1996; 宋林生等, 1999)。本实验结果表明, 翘嘴红的遗传多样性处于较低水平, 虽然目前从养殖状况来看, 未出现明显的经济性性状衰退现象。因此, 切实加强了对现有资源的科学管理和保护, 特别注意避免人工育苗中有效繁育群体过小等易于引起种质资源衰退的繁育方式, 翘嘴红资源的持续利用将成为可能。

参 考 文 献

- 王桂芹, 周洪琪, 董永利等, 2004. 翘嘴红 幼鱼最适蛋白需求量的研究. 吉林农业大学学报, 26(5): 556—560
- 尹洪滨, 尹家胜, 徐 伟等, 2003. 兴凯湖翘嘴红 肌肉营养成分分析. 中国水产科学, 10(2): 82—84
- 权洁霞, 戴继勋, 沈颂平等, 2001. 梭鱼人工养殖群体和自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析. 海洋学报, 22(5): 82—87
- 李代淑, 明道来, 1991. 鳊 鱼类的营养价值. 氨基酸杂志, (3): 36—38
- 宋 平, 潘云峰, 向 筑等, 2001. 黄颡鱼 RAPD 标记及其遗传多样性的初步分析. 武汉大学学报(自然科学版), 47(2): 233—237
- 宋林生, 相建海, 李晨曦, 1999. 日本对虾野生种群和养殖群体遗传结构的 RAPD 标记研究. 海洋与湖沼, 30(3): 261—265
- 张四明, 邓 怀, 晏 勇, 2000. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 31(1): 1—7
- 邵 力, 郑国生, 卢建伟等, 1990. 四明湖水库翘嘴红 年龄、生长的研究. 浙江水产学院学报, 9(2): 95—102
- 赵吉伟, 叶继丹, 2000. 翘嘴红 小瓜虫病的防治. 水产学杂志, 13(1): 57—58
- 赵吉伟, 叶继丹, 2001. 饲料蛋白质含量对翘嘴红 生长的初步研究. 水产学杂志, 14(2): 22—25
- 郭水荣, 孙利荣, 张伟燕, 2003. 翘嘴红 大规模冬片鱼种培育试验. 水产科技情报, 30(3): 117—119
- 黄 权, 刘春力, 赵 静等, 2003. 松花江水系翘嘴红 生长模型的研究. 吉林农业大学学报, 25(1): 105—107
- Bielawski J P, Pumo D E, 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast strip bass. *Heredity*, 78: 32—40
- Conrad M, 1983. *Adaptability: the Significance of Variability from Molecular to Ecosystem*. New York: Plenum Press, 39—46
- Maria E D, Dadiel C, 1996. Genetic diversity of population of the fresh water shrimp *Macrobrachium borellii* evaluated by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology*, 16(4): 578—588

THE GENETIC DIVERSITY OF GERMPLASMS OF *ERYTHROCULTER ILISHAEFORMIS* BLEEKER REVEALED BY RAPD MARKERS

ZHANG Yong-Zheng¹, ZHANG Hai-Qi², SHAO Qing-Jun³, HE Zhong-Yang²
(1. Zhejiang Ocean University, Hangzhou, 311258; 2. Zhejiang Fishery Technical Extension Center, Hangzhou, 310012; 3. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310007)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to analyze the genetic diversity of cultivation stock of *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker. Amplification was done with 40 random primers, of which 14 produced distinctive and reproducible fingerprints. 121 sites were detected, and 40 of them were polymorphic. Genetic similarity among *E. ilishaeformis* populations varied 0.8878—0.9600 in average of 0.9201; and the genetic variability was 0.0799. Shannon index of phenotype diversity was 10.8824 and the Shannon's information index was 0.0899. The study indicates that the germplasm resource of the species was in a worrying situation, changing the current mode of artificial breeding, establishing more breed- and stock- farms, and enhancing the genetic diversity of the species are strongly recommended for protecting the fish resource.

Key words *Erythroculter ilishaeformis* Bleeker, Genetic diversity, RAPD