

文章编号:1005-8737(2000)01-0006-06

用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤 和 3 个地理种群鲤的亲缘关系

邹曙明¹, 楼允东², 孙效文³, 沈俊宝³

(1. 农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 上海 200090;

2. 上海水产大学 渔业学院, 上海 200090;

3. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:用 24 种随机引物对雅罗鱼亚科(Leuciscinae)的草鱼、鲤亚科(Cyprininae)的柏氏鲤和 3 个地理种群鲤(荷包红鲤、黑龙江野鲤和德国镜鲤)进行 RAPD 分析, 构建了这 5 种鱼类的基因组指纹图谱。通过对获得的基因组指纹图谱的量化分析, 利用 UPGMA 重建了它们之间的亲缘关系。结果鲤种内 3 个地理种群之间的相似性高于鲤和柏氏鲤种间的相似性, 而草鱼与另 4 种鲤亚科鱼类亚科之间的差异明显高于柏氏鲤、黑龙江野鲤、荷包红鲤和德国镜鲤的种间或种内差异。研究结果支持中国东部鱼类具有双重来源性的观点。

关键词:RAPD 指纹图谱; 草鱼; 柏氏鲤; 荷包红鲤; 黑龙江野鲤; 德国镜鲤; 亲缘关系

中图分类号:Q959.468; Q789

文献标识码:A

RAPD (Random amplified polymorphic DNAs)^[1,2]技术已广泛应用于水产动物群体遗传学中种属分类鉴定^[3~5]、动植物遗传连锁图谱的建立^[6,7]、基因定位和分离以及杂交后导入基因的追踪^[8,9]等。目前, RAPD 技术在原生动、昆虫、尤其是植物遗传多样性和系统学研究中取得了一些有启发意义的结果。

伍献文^[10,11]依据形态学和解剖学, 将中国鲤科 400 多个种划分为 10 个亚科。本文尝试应用 RAPD 技术检测鲤科雅罗鱼亚科的草鱼(*C. idellus*)、鲤亚科的柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini* Tchang)和鲤的 3 个地理种群荷包红鲤(purse red carp)、黑龙江野鲤(common carp)、德国镜鲤(mirror carp)这 5 种鱼类基因组 DNA 多态性, 据此分析它们之间的亲缘关系。

收稿日期:1998-12-28

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(863-101-05-01)

作者简介:邹曙明(1972-), 男, 江西宜黄人, 上海水产大学助教, 硕士, 从事种质资源与遗传育种研究。

1 材料和方法

1.1 材料来源

柏氏鲤为 1997 年 4 月从云南江川养殖场引进的 2 龄亲鱼, 黑龙江野鲤采自黑龙江抚远, 荷包红鲤采自江西婺源, 德国镜鲤与草鱼则来自黑龙江水产研究所引进的原种。

1.2 基因组 DNA 提取

取 0.6 g 尾鳍剪碎, 加入 500 μ l STE 缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl)。混匀后加入终浓度分别为 1% 的 SDS 和 200 μ g/ml 的蛋白酶 K, 56℃ 作用过夜。加入等体积饱和酚于转轮上缓慢转动抽提 1 h, 5 000 g 离心 10 min, 取上清液用等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提 0.5 h, 再取上清液加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA。DNA 干燥后(不能太干, 否则极难溶解)加入适量的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解, 于 4℃ 保存备用。

1.3 PCR 反应及 RAPD 产物的分离

RAPD 分析所用引物购自 Operon Technologies 公司。RAPD 扩增反应条件与 Willams 等^[1]相似。反应混合物中含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.001% 明胶, 0.1 mmol/L 每种 dNTP, 0.2 μmol/L 引物, 25 ng 基因组 DNA, 1 U TaqDNA 聚合酶(购于 Promega 公司), 反应总体积为 25 μl。于 PE 9600 扩增仪上进行扩增, 每个反应过程为 45 个循环, 1 个循环包括 93℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min。45 个循环后 72℃ 延伸 5 min。RAPD 产物用 1.5% 琼脂糖胶电泳分离, 0.5 μg/ml EB 染色后用 GDS 8000 凝胶成像系统(UVP 公司)进行拍摄, 并用 GelWorks 1D 软件包(3.00 版本)对每个扩增带 DNA 含量进行估算, 统计强带峰值强度(大于 120), DNA 含量(超过 50 ng)和弱带峰值强度(小于 120), DNA 含量(25 与 50 ng)。

1.4 数据处理

经电泳获得的基因组指纹图谱, 在同一电泳迁移位置上, 有 DNA 扩增条带为 1, 没有的记为 0。按公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算物种 X 和物种 Y 间的同源性, 其中, N_{xy} 是 X, Y 2 个体共享的 RAPD 标记数, N_x , N_y 分别为 X 和 Y 个体拥有的 RAPD 标记数。任意 2 个体间的遗传差异用遗传距离指数衡量^[12]。

1.5 聚类分析

距离法分析采用 PHYLIP 3.5C 版本软件包中的“UPGMA”程序进行聚类^[13]。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

利用 OPC-01、OPC-06、OPC-09、OPC-12、OPC-14、OPC-19、OPC-20、OPH-01、OPH-02、OPH-03、OPH-08、OPH-10、OPH-11、OPH-12、OPN-01、OPN-05、OPN-06、OPN-08、OPN-09、OPN-12、OPN-13、OPN-14、OPN-18 和 OPN-20 为引物的 PCR 扩增, 获得了这 5 种鱼类基因组指纹图谱(下文简称指纹图谱), 统计结果见表 1。从 5 种鲤科鱼类的 24 组指纹图谱中可以看出, RAPD 技术显示出良好的分辨率和具有丰富的多态性(图 1)。由于引物数原则上可任意增加, 有可能找到任何一个个体的特异性 RAPD 标记, 因此, RAPD 法在寻找遗传标记方面有着巨大的潜力。

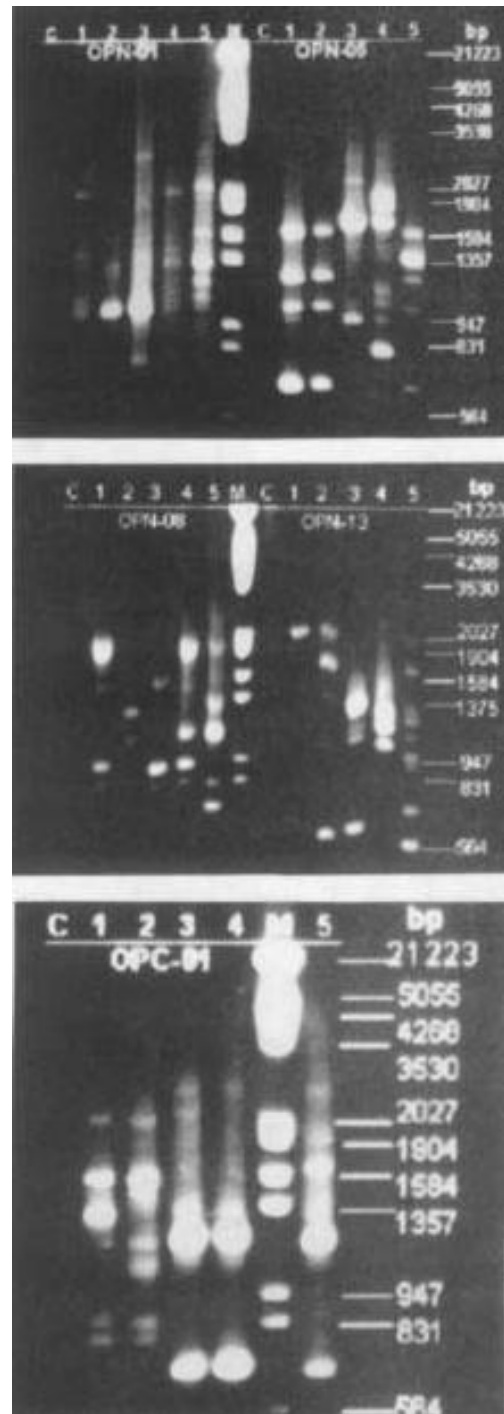


图 1 鲤科 5 种鱼类部分随机引物 PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis results of partly random primers

PCR amplified of five strains or species of Cyprinidae

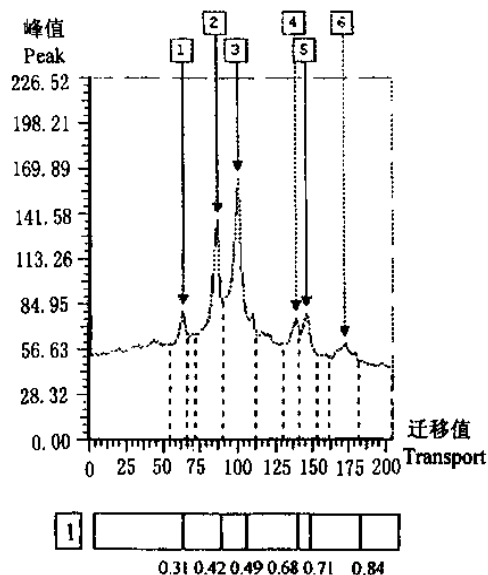
1 - 黑龙江野鲤(common carp); 2 - 德国镜鲤(mirror carp); 3 - 荷包红鲤(purse red carp); 4 - 柏氏鲤(Bosha carp); 5 - 草鱼(grass carp); C - 对照(control); M - Marker(λDNA/Hind III + EcoR I)

表 1 24 个随机引物扩增结果

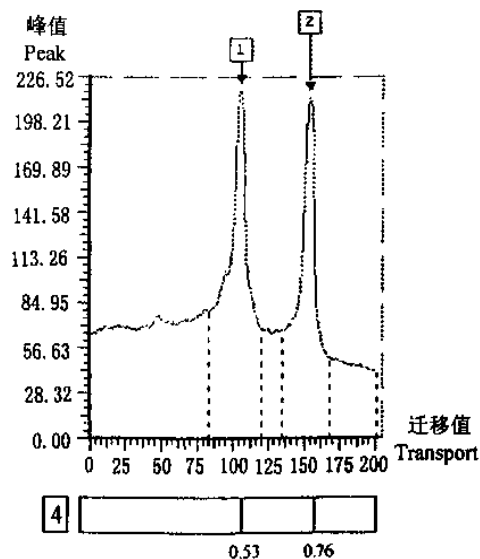
Table 1 The amplified results of 24 random primers

物种 Species	染色体数目(2n) Chromosome number	RAPD 标记数 Numbers of RAPD marker		总数 Total
		强带 High-intensified band	弱带 Low-intensified band	
柏氏鲤 Boshu carp	100	26	73	99
荷包红鲤 Purse red carp	100	29	103	132
黑龙江野鲤 Common carp	100	27	78	105
德国镜鲤 Mirror carp	100	21	69	90
草鱼 Grass carp	48	35	70	105
总计 Total		138	393	531

2.2 遗传距离指数及数据分析



对图 1 的 OPC-01 扩增条带 1(黑龙江野鲤)和条带 4(柏氏鲤)的测量结果(示 Rf 值)见图 2。从强扩增带和弱扩增带 2 个角度计算了共 5 份材料的 24 个引物 RAPD 分析所获得的数据,列成同源性矩阵(表 2)和遗传距离矩阵(表 3)。从 2 表可以看出,鲤种内 3 个地理种群之间的相似性高于鲤与柏氏鲤种间的相似性,而雅罗鱼亚科的草鱼与另 4 种鲤亚科鱼类亚科之间的差异明显高于柏氏鲤、黑龙江野鲤、荷包红鲤和德国镜鲤的种间或种内差异。由于历史悠久,栖息场所屡经变迁,以及人为选择的结果,鲤在形态上虽然发生了很多变化,形成了很多品种,如镜鲤、荷包红鲤等。但从表 1,2 可以看出,本文研究的鲤的 3 个地理种群仍具有较多的同源扩增带,遗传距离指数较小,亲缘关系较近,如黑龙江野鲤与德国镜鲤之间的遗传距离为 0.574 1(强带)和 0.699 0(弱带)。



PI(Peak Intensity)值大于 120(DNA 含量超过 50 ng)为强带,PI 值小于 120(DNA 含量介于 25 ng 于 50 ng 之间)为弱带。The value of PI(Peak-Intensity) more than 120(DNA more than 50ng) is high-intensified band, and below 120(DNA between 25 nng and 50 ng) is low-intensified band.

图 2 用 Gelworks ID 软件包(3.00 版本)对 24 个引物的扩增结果进行 DNA 含量的估算(灵敏度 140)

Fig.2 Using Gelworks ID program(3.00Version)to estimate the DNA content of each lane of 24 random primers(Sensitivity 140)

2.3 矩阵分析

根据强带和弱带的同源性得出的遗传距离矩阵(表 3),用 PHYLIP 3.5 C 软件包 UPGMA 程序进行聚类分析,重建了鲤科 5 种鱼类的亲缘关系,由图 3 可见,用强带(图 3a)、弱带(图 3b)及全部扩增带(图 3c)重建的系统树具有相同的拓扑结构,说明强带并不会影响亲缘关系的重建。雅罗鱼亚科的草鱼首先

同鲤亚科的柏氏鲤和鲤分化,柏氏鲤与鲤种内 3 个地理种群之间再发生分化。根据沈俊宝^[14]经验,鲤的 3 个地理种群之间不存在生殖隔离现象,它们之间可以自由进行杂交,而柏氏鲤与鲤种内 3 个地理种群之间存在生殖隔离现象,只有通过人工授精才能得到杂交后代。图 3 所建的鲤科 5 种鱼类的亲缘关系与前人通过形态学研究的结果完全相似^[10,11]。

表 2 RAPD 24 个引物强带和弱带的平均同源性矩阵值

Table 2 The average homologous values of high-intensified band and low-intensified band based on 24 sets of genomic fingerprints

物种 Species	德国镜鲤 Mirror carp	荷包红鲤 Purse red carp	黑龙江野鲤 Common carp	柏氏鲤 Boshi carp	草鱼 Grass carp
德国镜鲤 Mirror carp		0.335 3	0.428 6	0.096 8	0.050 0
荷包红鲤 Purse red carp	0.253 0		0.372 7	0.108 1	0.095 2
黑龙江野鲤 Common carp	0.301 0	0.230 0		0.093 8	0.073 2
柏氏鲤 Boshi carp	0.198 0	0.190 0	0.162 0		0.081 1
草鱼 Grass carp	0.176 0	0.152 0	0.143 0	0.192 0	

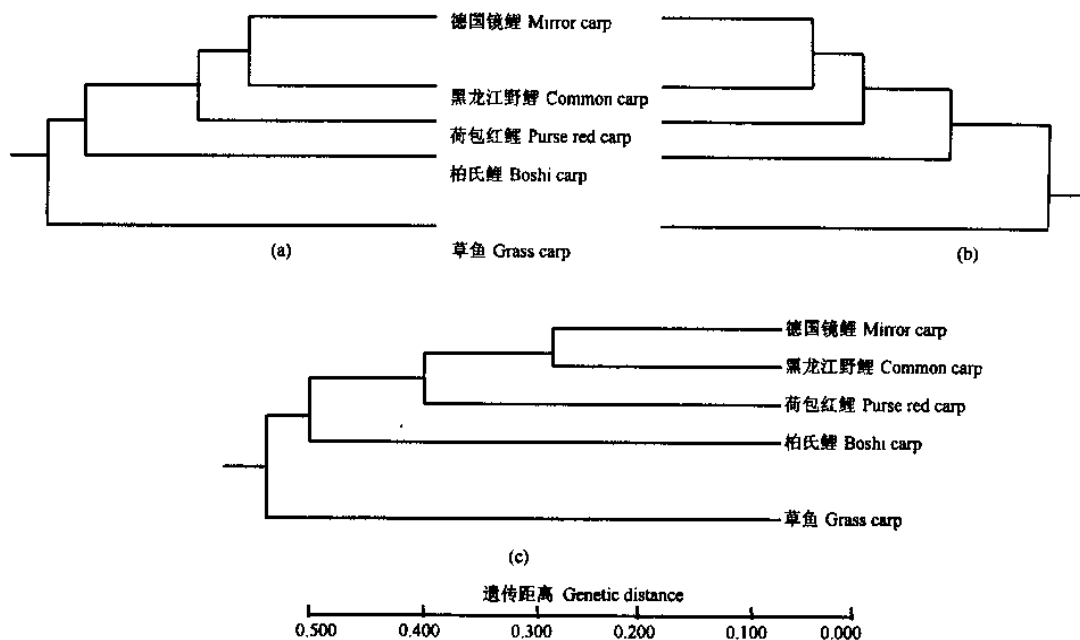
注:上三角矩阵为强带的平均同源性矩阵,下三角矩阵为弱带的平均同源性矩阵。Figures above the diagonal are the average homologous values of high-intensified band, and below the diagonal are the average homologous values of low-intensified band.

表 3 鲤科 5 种鱼类的遗传距离

Table 3 Genetic distance between 5 species of Cyprinidae

物种 Species	德国镜鲤 Mirror carp	荷包红鲤 Purse red carp	黑龙江野鲤 Common carp	柏氏鲤 Boshi carp	草鱼 Grass carp
德国镜鲤 Mirror carp		0.664 7	0.574 1	0.903 2	0.950 0
荷包红鲤 Purse red carp	0.747 0		0.627 3	0.891 9	0.904 8
黑龙江野鲤 Common carp	0.699 0	0.770 0		0.906 2	0.926 8
柏氏鲤 Boshi carp	0.802 0	0.810 0	0.838 0		0.918 9
草鱼 Grass carp	0.824 0	0.848 0	0.857 0	0.802 0	

注:上三角矩阵为强带的遗传距离,下三角矩阵为弱带的遗传距离。Figures above the diagonal are the genetic distances of high-intensified band, and below the diagonal are the genetic distances of low-intensified band.



遗传距离 $S = 1 - 1/F$, F 为 24 个引物计算的平均同源性值

Genetic distance $S = 1 - 1/F$, F is average value based on genomic fingerprints

图 3 UPGMA 法建立的鲤科 5 种鱼类的亲缘关系

Fig. 3 The constructed phylogenetic dendrogram of 5 strains or species of Cyprinidae

(a) 对强带的遗传距离矩阵进行 UPGMA 聚类 UPGMA dendrogram using genetic distance of high-intensified band; (b) 对弱带的遗传距离矩阵进行 UPGMA 聚类 UPGMA dendrogram using genetic distance of low-intensified band; (c) 对强带和弱带的遗传距离进行 UPGMA 聚类 UPGMA dendrogram using genetic distance of high-intensified band and low-intensified band

3 讨论

鲤科亚科类群分布上存在 7 个不同组合区,我国处于几乎包括鲤科全部亚科的东亚区。本文研究所涉及到的鲤亚科 2 个种及 1 个种的 3 个地理种群:柏氏鲤仅限于云南高原水库,地理位置上属于中国-印度区;德国镜鲤和黑龙江野鲤共属于旧北区;荷包红鲤栖息于江西婺源山区,应当属于中国东部。伍献文^[11]将中国东部看作为混合地带,有些鱼类从旧北区来,也有些来自中国-印度区,该观点揭示了中国东部鱼类的双重来源^[15]。本研究证明,鲤的 3 个地理种群首先同柏氏鲤分化,然后荷包红鲤再同镜鲤和黑龙江野鲤分化,支持了中国东部鱼类具有双重来源性的观点。

RAPD 作为研究亲缘关系的一种新方法在生物种内不同品系间以及种间都进行了尝试,从已发表的有关报道来看,RAPD 技术主要是通过对扩增产物电泳条带有无的统计来重建物种的亲缘关系。至少有两个方面影响重建的物种亲缘关系的准确性:(1)由于 RAPD 扩增产物未经严格的同源性鉴定,产物中同一迁移率的条带可能包含不同源的 2 种或 2 种以上的序列,(2)扩增某个 RAPD 片段的不同基因组之间存在模板拷贝数的差异。同源性鉴别误差可以通过对扩增产物的克隆及 Southern 杂交加以排除,而基因组模板拷贝数的差异能通过扩增带浓度的强弱反应出来。本文试图通过分别统计强带(大于 50 ng)和弱带(25~50 ng)的平均同源性矩阵,用 UPGMA 法对强带、弱带和全部扩增带的距离矩阵进行聚类,结果却是它们具有相同的拓扑结构,但到底这些因素影响有多大,还有待于大量数据的积累分析。

参考文献:

- [1] Williams J G K, A R Kubelik, K J Livak, et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6 531 - 6 535.
- [2] Welsh J, M McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7 213 - 7 218.
- [3] 李思发,吕国庆,贝纳切兹.长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. *动物学报*, 1998, 44(1): 82 - 93.
- [4] 陈洪,杨靖,薛国雄,等. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比例研究中的应用[J]. *科学通报*, 1994, 39(7): 661 - 663.
- [5] 薛国雄,刘 廉,刘 洁. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析[J]. *中国水产科学*, 1998, 5(10): 1 - 5.
- [6] Postlethwait J H, S L Johnson, C N Midson, et al. A genetic linkage map for the Zebrafish[J]. *Science*, 1995, 264: 699 - 703.
- [7] Stephen L J, Michael A G, Michele J, et al. Centromere - linkage analysis and consolidation of the Zebrafish genetic map [J]. *Genetics*, 1996, 142: 1 277 - 1 288 -
- [8] Martin G B, John G K. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas resistance* gene in tomato by using random primer and near - isogenic lines[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2 336 - 2 340.
- [9] Paran I. Identification of markers linked to disease resistance gene by Bulk Segregant Analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 1 021 - 1 026.
- [10] 伍献文. 中国鲤科鱼类志(上卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1964. 5 - 20.
- [11] 伍献文. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海:上海人民出版社, 1977. 329 - 419.
- [12] Gwakisa P S, Kemp S J, Tale A J. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers[J]. *Animal Genetics*, 1994, 25: 89 - 94.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor - joining method: a new method for restriction phylogenetic tree [J]. *Mol Bio Evol*, 1987, 4: 406 - 425.
- [14] 沈俊宝,刘明华. 荷包红鲤抗寒品系的筛选和培育[J]. *淡水渔业*, 1988, 3: 14 - 17.
- [15] 陈湘麟,乐佩琦,林人端. 鲤科的科下类群及其宗系发生关系[J]. *动物分类学报*, 1984, 9(4): 424 - 438.

[1] Williams J G K, A R Kubelik, K J Livak, et al. DNA

Study on phylogeny relationship of grass carp, Boshi carp and 3 populations of common carp by RAPD fingerprints

ZOU Shu-ming¹, LOU Yun-dong¹, SUN Xiao-wen², SHEN Jun-bao²

(1. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Genomic fingerprints of 5 species/strains: grass carp (subfamily Leuciscinae), *Cyprinus pellegrini* Tchang (subfamily Cyprinidae) and 3 geographic groups of *Cyprinus carpio haematopterus* (purse red carp, common carp and mirror carp, subfamily Cyprinidae), were constructed with 24 RAPD primers. By analysing the data of genomic fingerprints, the genetic relationship of the 5 species/strains was reconstructed with UPGMA. The reconstructed phylogeny showed that the relationships between the 3 geographic groups of *Cyprinus carpio haematopterus* were more closer than that of the 3 with *Cyprinus pellegrini* Tchang, and the distances between grass carp and the 4 species groups of subfamily Cyprinidae was more obvious than those within subfamily. The result supports the opinion that the fish in east China have two-fold origination.

Key words: RAPD fingerprints; grass carp; Boshi carp; purse red carp; common carp; mirror carp; phylogeny family