

## 三江水系草鱼种群 RAPD 分析\*

薛国雄 刘 棘 刘 洁

(中国科学院发育所, 北京 100080)

**摘 要** 用 120 个含 10 碱基的随机引物, 对长江、珠江、黑龙江三大水系的草鱼产卵场及太湖中捕获的草鱼进行覆盖性的 RAPD 分析, 实验共扩增出 2346 条重复性高而清晰的 DNA 带, 获得多态性片段 844 条。结果表明, 每一水系的草鱼种群均有其特征性基因图谱, 可作为种群鉴定的依据; 统计学分析后绘制的遗传距离树状图与经典的数量遗传、质量遗传分析结果相吻合。

**关键词** 草鱼种群, RAPD, 长江, 珠江, 黑龙江

长江、珠江、黑龙江三大水系是我国淡水鱼类的基因库。草鱼是我国“四大家鱼”中产量高的优良种。由于地理隔离, 起源于中国平原区的草鱼原种已分散到全国各个水域, 形成不同的隔离种群<sup>[1]</sup>。如今生产上的盲目性和近亲交配使草鱼种群出现退化现象, 丧失了优良性状, 造成草鱼基因库的污染和萎缩, 对草鱼这一优良种的种质资源保护不利。我国的科技工作者, 过去在草鱼的数量遗传、质量遗传及遗传的生化指标等方面做了大量的工作, 但在分子生物学上的研究却比较少。这使这一优良种得到很好的保护、利用和改造, 需要对草鱼的基因库进行分析, 搞清现今各水域中草鱼种群的遗传多态性和亲缘关系, 研究其遗传背景, 从而找到原始种群, 筛选出具有优良性状而又不易发生退化的优良种群, 这对以后的增产养殖是起决定作用的。

RAPD 技术是在 PCR 技术基础上发展起来的前沿分子生物学技术。它利用含 9-10 个碱基的随机引物, 将所研究的基因组作为模板, 进行扩增。由于随机引物的多样性, 就可以对整个基因组进行覆盖性的检测。此方法简便、准确性高, 且不需要事先确定目的基因的序列<sup>[2,3,10]</sup>。因此, 本实验采用 RAPD 方法对三江水系草鱼产卵场以及长江水系太湖地区的不同草鱼种群进行 DNA 检测, 分析它们的遗传多态性及绘制遗传距离树状图, 并与经典的研究(如同功酶、基因频率、等位基因等)<sup>[1]</sup>进行比较, 探讨用 RAPD 方法分析鱼类种群基本特征及对鱼类种群加以区分的可能性和优越性, 并研究种质资源保护中的分子遗传学<sup>[4]</sup>。

### 1 材料与方法

收稿日期: 1997-03-17。

\* 本课题获中国水产科学研究院淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室资助。

**1.1 草鱼 DNA 的提取** 三江水系草鱼由各自产卵场附近捕捞,即长江水系的宜昌下江段、珠江水系的肇庆附近、黑龙江水系的同江附近,及无锡市太湖地区。每组 10 条成鱼肝,经冰冻保存后按常规方法提取 DNA。提取方法详见《分子克隆》。

**1.2 RAPD 分析** 用含 10 个碱基的随机引物共 6 组 120 个引物,以不同水系、地区的草鱼 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增后产物经琼脂糖凝胶电泳分析,确定重复性后对合格区带进行统计学分析。根据 Hennig 程序分析法绘制出遗传距离树状图<sup>[12~16]</sup>。

**1.2.1 引物** 10 个碱基引物购自中科院遗传所。用 A、B、C、D、E、Z 共 6 组引物,每组 20 个随机引物。

**1.2.2 RAPD 反应** 在 25 $\mu$ l 体积中进行,反应体系含有 10mM Tris·Cl (pH8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (W/V) Gelatin (明胶), 0.2 $\mu$ M Primer (引物), 0.1mM dNTP, 样品 DNA 几个纳克—几十个纳克, Taq 酶为 1 个单位。

**1.2.3 步骤** 将引物、缓冲液、DNA 及 Taq 酶依次加入 0.5ml 离心管,混匀后加入 30 $\mu$ l 石蜡油防止液体蒸发。将离心管置入 PCR 仪,反应条件是:94℃ 变性 5 分钟,循环 1 次;94℃ 变性 55 秒钟,38℃ 复性 30 秒钟,72℃ 延伸 2 分钟,经 40 次循环后,72℃ 延伸 10 分钟,循环 1 次。扩增产物在 1.2%—1.5% 琼脂糖中走胶,电泳缓冲液为 1×TBE 缓冲液。在 150V 电压下电泳 1—2 小时后将胶置于 EB 中染色。紫外灯下照像<sup>[5]</sup>。

**1.3 统计学分析** 参照文献<sup>[12~15]</sup>,用 Hennig 86 version 1.5 程序作数据分析,并作出树形图。建立外群,把所研究物种的每一特征建立数据矩阵,从中得到多个树形图,通过数理计算找出最简约的树形图作为唯一答案。

在 Hennig 86 程序中用数值 0, 1, 2... 代表物种每一特征的不同状态,不详的特征用“?”表示,以建立数值矩阵,从中计算出各种群在树形图上的分布,并得到在每一分支点的假想祖先的状态参数。

## 2 结果

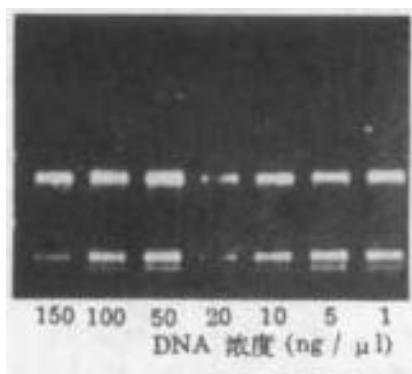


图 1 不同样品浓度对扩增条带的影响  
Fig. 1 Effect of varying sampling concentration on the number and position in band display of DNA amplification

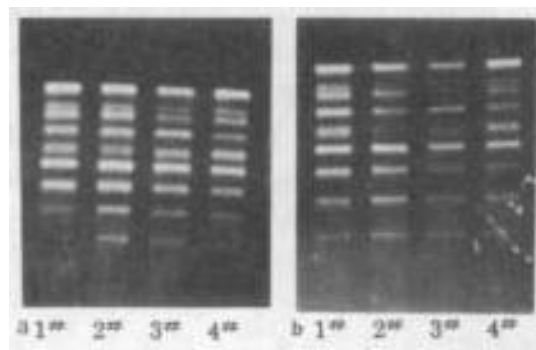


图 2 同一反应参数下,不同时期实验 PCR 反应的重复性  
Fig. 2 Repeation of PCR Reaction in different experimental period under the same reaction parameter

120 个引物中除极少量不能扩增出明显的扩增条带外,实验共扩增出 2346 条高清晰度、高重复性的 DNA 片段,平均每个引物产生 5.75 条带。片段大小在 100bp—3000bp 范围之

间。产生多态性 DNA 片段的引物有 71 个, 共计获得 844 条多态性片段。片段的统计是以其碱基长度差别为依据而不以其条带在凝胶上的显色强弱不同为依据。

**2.1 RAPD 方法的重复性** 图 1 是将黑龙江草鱼(1<sup>#</sup> 草鱼)的七个稀释度 DNA 用引物 D<sub>5</sub> 扩增得到的。说明 DNA 浓度在 1~200 ng/μl 的范围内变化不会影响 RAPD 表型。

图 2 是将四种草鱼(依次为 1<sup>#</sup>: 黑龙江、2<sup>#</sup>: 长江、3<sup>#</sup>: 太湖、4<sup>#</sup>: 珠江, 下同)用引物 Z<sub>15</sub> 扩增得到的。图 2a 和图 2b 为相距一周的两次实验在完全相同的参数下得到的结果。说明不同时期实验反应的重复性很好。



图 3 四个种群完全无差异的图谱

Fig. 3 Electrophoretic pattern showing little difference among four population of grass carp

**2.2 RAPD 的分辨率** 图 3 说明四个种群在引物 A<sub>6</sub> 中扩增完全没有差异。

图 4 说明用 5 种引物 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> 所扩增的每种样品特征图谱各不相同。

图 5 说明用引物 C<sub>13</sub> 扩增所得图谱与 Z<sub>9</sub>, B<sub>19</sub>, C<sub>7</sub> 引物的比较有明显的差异。

### 2.3 数值统计

**2.3.1 扩增出的 2436 条 DNA 带** 长江 617 条, 珠江 597 条, 黑龙江 621 条, 太湖 601 条。

**2.3.2 四个种群的差异程度** 108 个引物中有 71 个扩增出差异带, 检出率为 66%; 2436 条扩增带中有 844 条差异带, 占 34%。

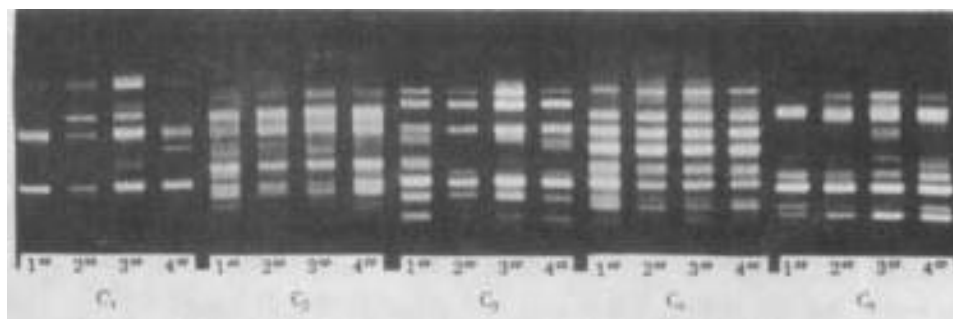


图 4 不同引物所扩增的差异明显的带型

Fig. 4 Patterns with distinct differences in amplification induced by different primers

**2.3.3 种群关系分析** 使用 Hennig 软件对数值进行分析。每一样品中的条带有无分别用“1”或“0”代表。通过程序运行得到草鱼种群关系树状图(见图 6)。

## 3 讨论

在各引物扩增出的差异带中, 有一些条带出现的重复性好, 条带清晰, 而且在不同的水系群体中又是各不相同的。因此, 如果将这些条带组合起来, 将可以成为各个群体的特征性谱系。如果利用的引物更多, 特征性谱带就会更多, 这将对草鱼种群鉴定及种群纯度分析有极大帮助。只需将所测鱼种的 RAPD 图谱与鱼种的特征图谱比较, 如果差异不大或无差异, 则可判定此鱼属于某个种群; 如果一个种群内不同个体的 RAPD 图谱很不均一, 则此种群的

基因杂合程度较高。

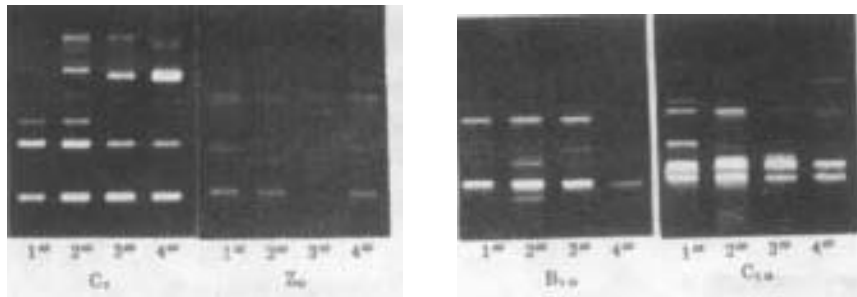


图 5 四个种群有明显差异的图谱

Fig.5 Patterns with distinct differences among four population of grass carp

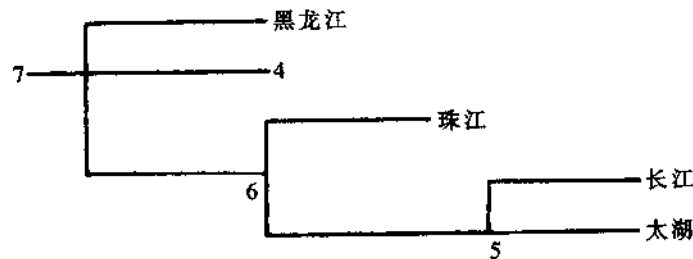


图 6 草鱼种群关系树状图

Fig.6 Pedigree tree for relation among population in grass carp

说明:7,6,5 为程序计算而得出的假想祖先;4 为外群,即假想的一个鱼种群,在输入程序时人为任意确定,用来与所检验的四个鱼种群相比较。

本实验输入了  $211 \times 4$  条差异条带,而程序运行中发现,只要输入 25 条差异带(四个样品共  $25 \times 4 = 100$  条)就可得到正确的种群关系树状图;以后随着输入条带的增多,树状图一直保持不变(虽然图距单位有所变动)。这说明 RAPD 方法是灵敏、稳定、可靠的。

本实验中从 RAPD 实验数据分析而得到的遗传距离树状图与经典的形态分析,特别是作为遗传指标的同工酶的分析结构基本上是一致的。即长江水系宜昌段的鱼群和太湖水域鱼群遗传距离最小,主要原因可能是它们本来都属于长江水系之故。而长江与珠江种群的遗传距离次之,黑龙江种群与其余三者遗传距离最大。实际上草鱼本来起源于中国江河平原,以后才扩展到珠江和黑龙江。由于地形与生态条件变化形成了地理隔离,便分别在不同水系里形成遗传性能上互有差别的孟德尔繁育群体。造成黑龙江草鱼差异较大的原因可能是因为黑龙江所处纬度较高,其地理条件与长江、珠江有很大差异。黑龙江中的草鱼种群位于其自然分布区的最北端,属于地理分布上的边缘群体,而长江、珠江水系的草鱼种群属于中央群体。所以,后两者遗传距离较近。

## 参 考 文 献

- [1] 李思发,1990. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究. 上海科学技术出版社(上海).

- [ 2 ] 陈洪等, 1994. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用. 科学通报, 39(7): 661 - 663.
- [ 3 ] Williams, et al., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531 - 6535.
- [ 4 ] S. Kresovich, et al., 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica Oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet* 85: 190 - 196.
- [ 5 ] A. Abo. elwafa, et al., 1995. Intra and inter - specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 90: 335 - 340.
- [ 6 ] W. Y. Wang, et al., 1994. Molecular evidence for the hybrid origin of *Paulownia Taiwaniana* based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA. *Theor Appl Genet* 89: 271 - 275.
- [ 7 ] Rani. V., et al., 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus Deltoides* Marsh. *Plant Cell Rep.*, 14(7): 458 - 462.
- [ 8 ] Anzai - Y., et al., 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. 2 *Actinomycetes*. *J. Antibiot* 47(2): 183 - 193.
- [ 9 ] Pinto. F. M., et al., 1995. Molecular genetic characterization of plant somatic hybrids. *In - Vitro - Plant* 31(2): 96 - 100.
- [ 10 ] Macpherson. J. M., et al., 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cycles, and the effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell. Probes* 7(4): 293 - 299.
- [ 11 ] Abed. Y., et al., 1995. Variation of RAPD fingerprint patterns using different DNA - extraction methods with Gram-positive bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11(2): 238 - 239.
- [ 12 ] [英]布鲁克斯, (戴爱云、薛大勇等译), 1987. 支系分类学的原理和方法. 北大出版社.
- [ 13 ] Hennig. W., 1986. *Phylogenetics systematics*. Univ. Illinois Press, Urbana.
- [ 14 ] Farris. J. S., 1980. The efficient diagnoses of the phylogenetic system. *Syst. Zool.*, 29: 386 - 401.
- [ 15 ] Farris. J. S., 1984. Haeckel or Hennig? The cordian knot of characters, developments and procedures in phylogeny. *Human Dev.* 27(5/6): 262 - 267.
- [ 16 ] Farris. J. S., 1986. On the boundaries of phylogenetic systematics. *Cladistics* 2(1): 14 - 27.

## RAPD ANALYSIS OF GRASS CARP POPULATION IN THREE - RIVER WATERS

Xue Guoxiong   Liu Ji   Liu Jie

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**ABSTRACT** An overall RAPD analysis of DNA of grass carp population located in three - river waters (Yangtze River, Zhujiang River and Heilongjiang River) and Taihu Lake in China was made with 120 primers of random decamer oligonucleotide, for the purpose of identifying the genome composition and investigating the affinity of these grass carp populations. In our experiment, 2436 distinct and highly repeated fragments were obtained. The results showed that every population of grass carp in different waters has its own unique specified genome pattern which might be used to identify different population of grass carp. Following the statistical analysis, a pedigree tree was constructed which tallies with the results of the traditional analysis on quantitative and qualitative inheritance.

**KEY WORDS** Grass carp population, RAPD, Yangtze River, Zhujiang River, Heilongjiang River.