

RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用*

董在杰 夏德全 吴婷婷 杨弘 王涛

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘要 从40个引物中筛选了27个引物,对兴国红鲤、德国镜鲤和苏联镜鲤进行随机扩增多态DNA分析,共得到199条带,其中155条带(占77.9%)具多态性。计算得出这3个群体内的相似系数分别为:兴国红鲤0.722,德国镜鲤0.827,苏联镜鲤0.787,表明群体内的遗传变异较大;群体间的遗传距离为:兴国红鲤与德国镜鲤0.092,兴国红鲤与苏联镜鲤0.105,德国镜鲤与苏联镜鲤0.077,表明群体间的亲缘关系相近。兴国红鲤与苏联镜鲤遗传距离最大,推断这2个品种间的杂种优势较强,与育种实践一致。

关键词 RAPD, 杂种优势, 兴国红鲤, 散鳞镜鲤

1990年,Williams和Welsh两个实验室利用PCR技术几乎同时建立了随机扩增多态DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)分子生物学技术^[1,2]。RAPD分析是极为有效方便的DNA遗传标记系统之一,该技术已广泛应用于生物的遗传多样性、群体遗传、亲缘关系分析、遗传连锁图的构建、特定基因的标记和定位等许多研究领域。我国对作物的杂种优势机理和预测研究进行的较多^[3],但在鱼类上未见报道。本文通过对兴国红鲤、德国镜鲤和苏联镜鲤已在生产上显示杂种优势的杂交组合的RAPD指纹图谱,分析所得结果与杂种优势之间的关系,从而提出预测鱼类杂种优势的分子遗传学依据,并利用RAPD技术探讨产生杂种优势的分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 兴国红鲤5尾、德国镜鲤3尾和苏联镜鲤3尾均引自长江水产研究所。

1.1.2 随机引物 购自中国科学院遗传所,均为美国Operon公司产品。引物序列见表1。

收稿日期:1997-10-31

* 本研究由国家自然科学基金(39670583)和农业部科学基金(渔95-生-96-04)资助。

1.1.3 基因组DNA的提取 实验鱼尾静脉抽血,ACD抗凝,取30 μ l全血置于470 μ l SET(0.15 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中,加SDS和蛋白酶K分别至终浓度0.5%和200 μ g/ml,55 $^{\circ}$ C水浴消化过夜,用等体积饱和酚抽提2次,再分别用等体积酚/仿/醇、仿/醇各抽提1次,无水乙醇沉淀,加适量TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)于55 $^{\circ}$ C水浴溶解DNA。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR反应 所用试剂均购自华美公司,反应总体积为25 μ l。其中,10 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 15 ng引物, 1.5单位Taq酶, 20 ng模板DNA。阴性对照不加模板DNA。于反应混合物上加约25 μ l矿物油,在P.E. 480上进行扩增反应。其参数为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,然后在94 $^{\circ}$ C变性1 min, 36 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸2 min,反应循环45次,最后在72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物用含溴化乙锭的1.4%的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察拍照。

1.2.2 统计方法 所有标记的统计均以带存在为1,带不存在为0。按Lynch^[4,5]的方法计算群体内、群体间相似系数和遗传距离。个体间相似系数:

$$S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

其中: n_{xy} 是个体 x 和 y 共有条带数, n_x 和 n_y 分别是个体 x 和个体 y 所扩增出的条带数。群体内的相似系数 S 为 1 个群体内所有个体间相似系数的平

均值。群体间相似系数 S_{ij} 是从群体 i 和群体 j 中随机配对的 2 个体的相似系数的平均数。

$$\text{遗传距离 } D_{ij} = -\ln(S_{ij} / \sqrt{S_i S_j})$$

表 1 随机引物序列

Table 1 Sequence of random primers

引物 Primer	序列(5'→') Sequence	引物 Primer	序列(5'→') Sequence	引物 Primer	序列(5'→') Sequence	引物 Primer	序列(5'→') Sequence
P01	GTAGCACTCC	Y01	GTGGCATCTC	P11	AACGCGTCGG	Y11	AGACGATGGG
P02	GCGGCACGCA	Y02	CATCGCCGCA	P12	AAGGGGAG	Y12	AAGCCTGCGA
P03	CTGATACGCC	Y03	ACAGCCTGCT	P13	GGAGTGCCTC	Y13	GGTCTCGGT
P04	GTGTCTCAGG	Y04	GGCTGCAATG	P14	CCAGCCGAAC	Y14	GGTGCATCTG
P05	CCCCGGTAAC	Y05	GGCTGCGACA	P15	GGAAGCCAAC	Y15	AGTCGCCCTT
P06	GTGGGCTGAC	Y06	AAGGCTCACC	P16	CCAAGCTGCC	Y16	GGGCAATGT
P07	GTCCATGCCA	Y07	AGAGCCGTCA	P17	TGACCCGCT	Y17	GACGTGGTGA
P08	ACATCGCCCA	Y08	AGGCAGAGCA	P18	GGCTTGGUCT	Y18	GTGGAGTCAG
P09	GTGGTCCGCA	Y09	AGCAGCGCAC	P19	GGGAAGGACA	Y19	TGAGGGTCCC
P10	TCCCGCTAC	Y10	CAAACGTGGG	P20	GACCCTAGTC	Y20	AGCCGTGGAA

2 结果

2.1 RAPD 标记的多态性

40 个引物中, Y02、Y03、Y12、Y15、Y16、Y17、P03、P16 和 P18 无扩增带, Y01、Y08、Y14 和 P10 扩增的带很弱, 不列入统计。其余 27 个引物每个均能扩增出 2~10 条稳定清晰的条带, 共扩增出 199 条带, 片段大小在 300~2 200 bp 之间, 平均每个引

物产生 7.4 条带。其中有 44 条带(占 22.1%)是 3 个群体间稳定存在的公共带, 155 条带(占 77.9%)具有多态性。图 1 为引物 P09 和 Y18 扩增产物的电泳图谱。由图 1 可见, 由不同引物扩增出的片段的多样性有较大差别, 图 1(A)中, 除了在 708 bp、1 122 bp 和 1 175 bp 附近有 3 条共有带外, 其余 6 条带均呈现出多态性, 而图 1(B)中, 除了在 831 bp 左右有 1 条多态带以外, 其余均为各群体共有的条带。

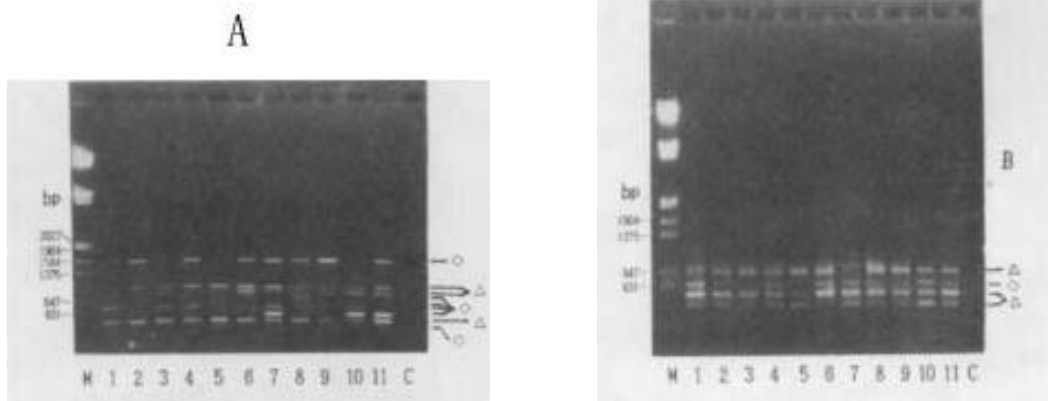


图 1 用引物 P09(A)和 Y18(B)扩增的鲤鱼 RAPD 图谱

Fig. 1 RAPD patterns of carps using primer P09 (A) and Y18(B)

M: 分子量标记 (λ DNA/EcoR I + Hind III) marker; C: 阴性对照 negative control; 1~5: 兴国红鲤 Xingguo red carp; 6~8: 德国镜鲤 Germany mirror carp; 9~11: 苏联镜鲤 Russia mirror carp; \triangle : 共有带 shared band; \diamond : 多态带 polymorphic band.

2.2 兴国红鲤、德国镜鲤和苏联镜鲤的相似系数和遗传距离

按 Lynch^[4]的方法计算各品种(系)内及品种(系)间的相似系数,结果群体内相似系数兴国红鲤为 0.722,德国镜鲤为 0.827,苏联镜鲤为 0.787。由此可见,这 3 个群体内相似系数较小,表明它们的遗传变异程度较大。

兴国红鲤与德国镜鲤群体间相似系数为 0.705,兴国红鲤与苏联镜鲤群体间为 0.679,德国镜鲤与苏联镜鲤群体间为 0.747,说明这 3 个群体中兴国红鲤和苏联镜鲤亲缘关系较远,德国镜鲤和苏联镜鲤的亲缘关系较近。

按 Lynch^[5]方法计算出兴国红鲤与德国镜鲤的遗传距离为 0.092,兴国红鲤与苏联镜鲤为 0.105,德国镜鲤与苏联镜鲤为 0.077,说明这 3 个群体间的亲缘关系相近。同时也可看出,在这 3 个群体中,兴国红鲤与苏联镜鲤的亲缘关系相对较远,而 2 种镜鲤之间的亲缘关系相对较近,这与群体之间相似系数所得的结果一致。

3 讨论

RAPD 分析可以为群体遗传参数的测定提供有效的标记^[6]。本实验所得 199 个 RAPD 标记中,有 155 条带(77.9%)具多态性,说明 RAPD 作为 1 种 DNA 标记,有较高的多态性。大豆属自花授粉,遗传背景较窄,同一品种的个体较少甚至没有遗传差异,Caetano - Anolles G 等^[7]运用 RAPD 技术检出大豆的 6 个多态性位点,因而证实 RAPD 的确具有较高的多态性检出率。本实验结果与其相吻合。

在一定范围内遗传距离较大的品种间产生的杂种优势较强,因此,遗传距离指标可能为选配杂种优势较强的亲本组合提供依据。Melchinger 等^[8]以玉米为材料,研究了各品系遗传距离(Roger's distance, RD)与 F₁ 杂种产量的相关性,结果发现,当 RD<0.54 时,遗传距离与杂种优势正相关,而在亲缘关系较远的组合中,遗传距离与杂种优势无相关性。本实验测得兴国红鲤与苏联镜鲤之间的遗传距离最大,鉴于它们在分类学上同属鲤科、鲤亚科、鲤属、鲤种中的不同品种,可以认为兴国红鲤♀×苏联镜鲤♂是亲缘关系较近的杂交组合。因此我们根据

遗传距离推断兴国红鲤和苏联镜鲤的杂交优势较大。在育种生产实践中,正是用这 2 个群体作为亲本而取得显著的杂种优势。

Bardakci^[9]用 RAPD 技术对奥利亚罗非鱼、莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼进行种和亚种的鉴定,发现奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼之间的遗传距离较大,这与奥尼杂交鱼具有显著杂种优势相符。兴国红鲤和苏联镜鲤为种内杂交(品种间杂交),而奥利亚和尼罗罗非鱼是种间杂交,前者在亲缘关系上比后者近。这也说明从兴国红鲤和苏联镜鲤的遗传距离可以推断出它们杂交所产生的杂种优势较强。

从兴国红鲤、德国镜鲤和苏联镜鲤群体内的相似系数来看,群体内遗传变异较大,说明这 3 个群体都有进行选育的潜力,尤其是能够产生较强杂种优势的 2 个亲本(兴国红鲤和苏联镜鲤)群体内的遗传变异相对较大,有必要对其进行选育,使它们产生最大程度的杂种优势。

参 考 文 献

- Williams J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531--6535
- Welsb J, M McClell, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213--7218
- 李春丽. 应用分子标记差异性预测作物杂种优势的研究进展. *遗传*, 1997, 19(1): 46--48
- Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478--484
- Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: *DNA Fingerprinting Approaches and Applications*. Burke t, et al. ed. Basel, 1990, 80: 113--126
- Lu R, G H Rank. Use of PAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*. *Genome*, 1996, 39: 655--663
- Caetano - Anolles G, et al. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology*, 1991, 9: 553--557
- Melchinger A E, et al. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. *Theor Appl Gen et*, 1990, 80: 488--496
- Bardakci F, D O F Skibinski. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 1994, 73: 117--123

Application of RAPD technique in a study of fish heterosis

Dong Zaijie Xia Dequan Wu Tingting Yang Hong Wang Tao

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract One hundred and ninety - nine RAPD fragments from Xingguo red carp, German mirror carp and Russian mirror carp, among which 155 (77.9%) were ployomorphic, were generated using 27 primers screened from 40 primers. Their within - population similarity indices are 0.722 Xingguo red carp, 0.787 Ruassia mirror carp, 0.827 Germany mirrorcarp, indicating the rather great genetic variations within the 3 populations. The genetic distance between Xingguo red carp and Russia mirror carp is the largest (0.105). It is presumed that the heterosis between Xingguo red carp and Russia mirror carp is the highest.

Key words RAPD, heterosis, Xingguo red carp, scattered mirror carp

《中国水产科学》声明

(1)为了加强信息交流和扩大期刊影响,本刊作为核心期刊已于1996年首批加入了《中国学术期刊(光盘版)》,这对我们充分利用信息交流的集团化优势,提高期刊及其作者们的知名度和扩大国内国际影响有着重大意义。本刊作为光盘版的人编期刊,充分尊重作者的著作权益。在此本刊提请所有来稿作者注意,除非作者来稿时另有声明,一般均视为已同意来稿由本刊代为向《中国学术期刊(光盘版)》投稿,本刊支付的稿费中亦已包括这部分稿费。

(2)科技期刊加入因特网属世界科技出版潮流,是科技期刊国际化发展的重要途径。为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊已于1998年12月入网“ChinaInfo(中国信息)网络资源系统《电子期刊》”。本刊内容将按照统一格式制作编入ChinaInfo系统电子期刊,读者可上因特网进入ChinaInfo系统查询检索本刊内容,也欢迎各界朋友通过ChinaInfo系统向我刊提出宝贵意见、建议,或征订本刊(网址:<http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>)。所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律纳入ChinaInfo信息服务系统,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见将自己稿件纳入因特网传送交流的作者,请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

《中国水产科学》编辑部