

文章编号: 1000-1573(2013)04-0101-04

张家口坝上高背鲫鱼 RAPD 遗传多样性研究

韩青动¹, 吴江立², 陈 力³

(1. 河北农业大学 海洋学院, 河北 秦皇岛 066003;

2. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002;

3. 河北省海洋与水产科学研究院, 河北 秦皇岛 066005)

摘要: 采用 RAPD 技术从 40 个随机引物中筛选出 17 个引物对张家口坝上高背鲫鱼水泉淖群体的遗传多样性进行研究, 结果共检测出 71 个位点, 其中多态位点 25 个, 多态位点比例(P)为 35.2%, 平均每个引物提供的标记为 4.2 个; 利用 NTsyspc2.1 软件获得该水库野生鲫鱼群体 20 个个体间的遗传距离, 个体间遗传距离(D)在 0.007 2~0.140 7 之间, 平均为 0.063 5; 个体间遗传相似系数(S)在 0.859 3~0.992 8 之间, 平均遗传相似系数为 93.65%; 研究表明, 张家口坝上野生高背鲫鱼群体由于环境封闭, 没有外来品种引起的杂交现象, 基因纯和程度较高, 种群内遗传多样性低。

关键词: 高背鲫鱼; 随机扩增多态 DNA; 遗传多样性

中图分类号: S932.4

文献标志码: A

Study on genetic polymorphism (RAPD) of high-backed *Carassius auratus* from Zhangjiakou Bashang region

HAN Qing-dong¹, WU Jiang-li², CHEN Li³

(1. College of Ocean, Agricultural University of Hebei, Qinhuangdao 066003, China;

2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China;

3. Hebei Provincial Oceanic and Fishery Science Research Institute, Qinhuangdao 066005, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to detect the DNA polymorphism in high-backed *Cauratus auratus* from Zhangjiakou Bashang region. 17 random primers were used and 71 sites were generated, and there were 25 polymorphic among them, with a percentage of 35.2%. The average label of each primer was 4.2. The genetic distance matrix of *Cauratus* were calculated by using software NTsyspc2.1, the genetic distance (D) and genetic similarity(s) among the individuals were 0.007 2—0.140 7, 0.859 3—0.992 8 respectively. Result showed that, because of environmental sealing, no cross phenomenon caused by exotic breed, high-backed *Cauratus auratus* from Zhangjiakou Bashang region had a high gene pure level and low genetic diversity.

Key words: high-backed *Carassius auratus*; random amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic polymorphism

收稿日期: 2012-08-16

基金项目: 韩青动(1965-), 男, 汉族, 河北省秦皇岛人, 硕士, 副教授, 主要从事海洋渔业研究。

E-mail: 3150033@163.com.

遗传多样性是种群遗传结构变化的信息参数。通过对其进行研究可以为鱼类基因多样性的保护,防止鱼类天然基因库的破坏,保护鱼类种质资源,提供理论依据。目前 RAPD 技术在鱼类遗传图谱构建、种质鉴定等方面得到广泛应用^[1-14]。

张家口坝上高背型鲫鱼,俗称“高背鲫”,是名贵的土著鱼类品种,与普通鲫鱼相比,体高与体长比明显大,头小,尾柄短。该鲫鱼生长速度快、抗病力强、个体较大、肉质鲜美,且对生态条件适应性强,具有耐寒、耐低氧、食性广、繁殖力高等特点,能自然繁殖,群体数量补充快、可塑性强,主要分布在海拔 1 400 m 以上的河流、淖泊等天然水体及部分水库,是自然形成的三倍体鲫鱼,品种性状稳定,是一种优质的增养殖品种。目前国内外对张家口坝上野生高背鲫鱼的相关研究报道较少,只有少量生物学测量及养殖方面的研究报道^[15-16],本文采用 RAPD 技术对张家口坝上野生高背鲫鱼种群的遗传多样性进行分析研究,为该鲫鱼的种质资源评价和开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验鲫鱼取自张家口沽源县水泉淖。

试剂:40 条引物由 Invitrogen 公司合成,PCR 所用试剂购自 TaKaRa 公司

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 将肌肉组织放入灭过菌的匀浆器中,每 25~50 mg 组织中加入 1 mL DNAiso Reagent;使用匀浆器反复匀浆,直至没有明显块状组织沉淀;将裂解液转移至离心管中;组织裂解液经 $10\,000\times g$ 室温离心 10 min,将上清液转移至新的离心管;加入 DNAiso Reagent 1/2 体积量的无水乙醇,反复颠倒混匀 1~3 min, $4\,000\times g$ 室温离心 2 min 沉淀 DNA;缓慢地沿着离心管壁加入 1 mL 75% 的乙醇, $12\,000\times g$ 离心 5 min 后小心弃去乙醇;将除去乙醇后的基因组 DNA 沉淀在室温下干燥 5~15 s,缓慢加入适量的灭菌双蒸水溶解基因组 DNA,最后保存于 $-20\,^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 RAPD 分析 PCR 反应及其产物的检测:PCR 扩增反应总体积为 25 μL ,含有 2.5 μL 的 $10\times$ PCR Buffer 2.5 μL , dNTP Mixture 2 μL ,引物 1 μL , Taq DNA 聚合酶 0.25 μL ,模板 DNA 2 μL ,灭菌双蒸水 17.25 μL 。DNA 扩增仪为 BIOER XP,

PCR 条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,8 个循环之后,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,32 个循环,PCR 产物以 0.2% 的琼脂糖电泳分离,Goldview 染色,凝胶成像系统成像,观察并拍照。

RAPD 引物的筛选:随机引物采用 Invitrogen 公司 S 系列引物,经 3 次预试验选择扩增产物稳定,重复性好的引物,用于所有鲫鱼的随机扩增多态性分析。

1.2.3 数据处理 根据电泳图谱的条带分布情况,用 NTsyspc 2.1 软件计算样品之间的遗传距离 P ,任意 2 个个体或种群间的遗传相似率 S 根据遗传距离来计算: $S=1-P$ 。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

研究采用 40 个 10 bp 的随机引物对该鲫鱼的 DNA 进行扩增,结果筛选出 17 个引物能够得到清晰、稳定和可重复的条带用于数据分析。试验中的 17 个引物共计扩增出 71 条谱带,每个引物的扩增带数为 1~7 条(表 1),谱带大小在 100~2 000 bp 之间。

表 1 随机引物序列及扩增结果

Table 1 Random oligonucleotide primer sequences and results of amplification

名称 Name	引物序列 Sequence	带数 No. of bands	名称 Name	引物序列 Sequence	带数 No. of bands
S03	AACGCGTCGG	5	S23	CAGCGACAAG	1
S07	ACATCGCCCA	7	S29	AAGCCTCCCC	5
S09	GGCATACCGA	1	S31	GTGACCTCAG	4
S11	ACCCGGTCAC	5	S32	GTCGATGTCG	3
S14	GGGGTGACGA	6	S34	TCCACGGACG	5
S16	TCAGTCCGGG	2	S36	CTGTCCAGCA	4
S17	CAGCCTACCA	4	S38	CTGAAGCGGA	3
S20	AGTCGTCCCC	5	S22	GGGACGTTGG	6
S21	CTGCGCTGGA	5			

2.2 高背鲫鱼的遗传相似性与遗传距离

本试验采用了 17 个引物对 20 尾高背鲫鱼进行了遗传多样性的初步分析,17 个引物共扩增出 71 条带,部分引物的扩增条带见图 1,平均每个引物提供的标记为 4.2 个,其中多态位点数 25 个,占总检出位点数的 35.2%。

根据表 2 统计的平均值,该鲫鱼个体间遗传距离在 0.007 2~0.140 7 之间,平均遗传距离为 0.063 5,

平均遗传相似率为 93.65%,在这 20 尾鲫鱼中,遗传相似率最大值和最小值分别为 99.28%和 85.93%。多态位点多少即遗传相似率可以反映种群的遗传多样性,而遗传距离则反映种群内亲缘关系的远近程

度,是从不同角度对种群遗传性状的研究。从多态位点数和平均遗传相似率的初步分析看,鲫鱼种群内的遗传多样性低,可能是由于所取的鲫鱼均来自同一个水域,没有外来品种引起的杂交现象。

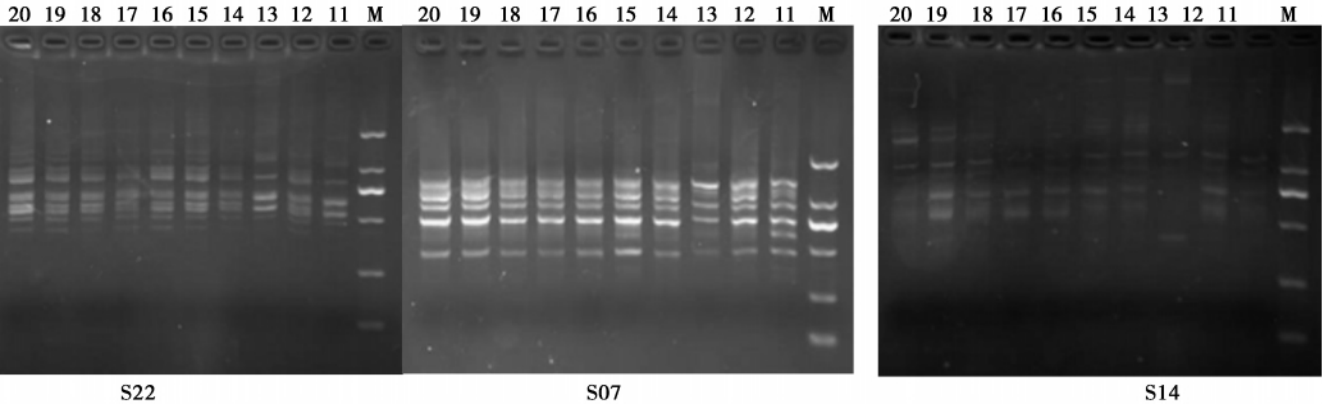


图 1 高背鲫鱼种群的 RAPD 图谱

Fig. 1 RAPD fingerprints of populations of crucian

表 2 高背鲫鱼个体间的遗传距离

Table 2 The genetic distance between individual carp

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	0.000 0	0.952 3	0.939 4	0.903 5	0.943 2	0.918 4	0.910 9	0.926 1	0.947 5	0.913 3	0.941 7	0.906 1	0.916 4	0.913 3	0.901 1	0.901 1	0.924 3	0.926 1	0.928 0	0.922 9
2	0.047 7	0.000 0	0.926 8	0.954 3	0.961 1	0.953 5	0.930 0	0.945 1	0.899 8	0.962 5	0.944 5	0.955 3	0.920 1	0.962 5	0.937 5	0.953 5	0.944 5	0.928 9	0.977 2	0.970 6
3	0.060 6	0.073 2	0.000 0	0.894 5	0.951 6	0.909 5	0.901 9	0.899 4	0.880 4	0.904 6	0.915 0	0.897 4	0.907 1	0.904 6	0.873 7	0.873 7	0.878 6	0.881 4	0.919 3	0.914 5
4	0.096 5	0.045 7	0.105 5	0.000 0	0.946 2	0.938 6	0.946 8	0.946 2	0.866 6	0.977 9	0.913 0	0.985 5	0.921 7	0.977 9	0.954 3	0.938 6	0.929 6	0.946 2	0.977 6	0.985 5
5	0.056 8	0.038 9	0.048 4	0.053 8	0.000 0	0.961 1	0.953 6	0.936 5	0.889 1	0.954 6	0.918 8	0.947 4	0.944 2	0.954 6	0.928 9	0.912 3	0.901 7	0.920 0	0.953 6	0.962 9
6	0.081 6	0.046 5	0.090 5	0.061 4	0.038 9	0.000 0	0.977 2	0.961 1	0.881 5	0.962 5	0.960 7	0.955 3	0.935 7	0.947 0	0.953 5	0.937 5	0.944 5	0.945 1	0.946 0	0.955 3
7	0.089 1	0.070 0	0.098 1	0.053 2	0.046 4	0.022 8	0.000 0	0.969 3	0.892 3	0.955 0	0.937 0	0.963 1	0.945 3	0.955 0	0.961 7	0.946 0	0.937 0	0.953 6	0.938 4	0.963 1
8	0.073 9	0.054 9	0.100 6	0.053 8	0.063 5	0.038 9	0.030 7	0.000 0	0.807 5	0.954 6	0.952 1	0.962 9	0.927 7	0.938 9	0.945 1	0.945 1	0.952 1	0.936 5	0.969 3	0.947 4
9	0.052 5	0.100 2	0.119 6	0.133 4	0.110 9	0.118 5	0.107 7	0.092 5	0.000 0	0.859 3	0.904 7	0.870 4	0.878 2	0.877 6	0.881 5	0.917 8	0.904 7	0.907 5	0.892 3	0.888 4
10	0.086 7	0.037 5	0.095 4	0.022 1	0.045 4	0.037 5	0.045 0	0.045 4	0.140 7	0.000 0	0.938 5	0.992 8	0.946 6	0.970 6	0.947 0	0.947 0	0.954 5	0.938 9	0.970 3	0.978 2
11	0.058 3	0.055 5	0.085 0	0.087 0	0.081 2	0.039 3	0.063 0	0.047 9	0.095 3	0.061 5	0.000 0	0.931 3	0.943 3	0.922 3	0.927 8	0.927 9	0.951 2	0.935 6	0.937 0	0.931 3
12	0.093 9	0.044 7	0.102 6	0.014 5	0.052 6	0.044 7	0.036 9	0.037 1	0.129 6	0.007 2	0.068 7	0.000 0	0.939 4	0.978 2	0.955 3	0.955 3	0.947 3	0.947 4	0.978 1	0.985 6
13	0.083 6	0.079 9	0.092 9	0.078 3	0.055 8	0.064 3	0.054 7	0.072 3	0.121 8	0.053 4	0.056 7	0.060 6	0.000 0	0.946 6	0.936 6	0.920 1	0.909 4	0.910 9	0.912 6	0.939 4
14	0.086 7	0.037 5	0.095 4	0.022 1	0.045 4	0.053 0	0.045 0	0.061 1	0.122 4	0.029 4	0.077 7	0.021 8	0.053 4	0.000 0	0.977 8	0.947 0	0.922 3	0.954 6	0.970 3	0.992 8
15	0.098 9	0.062 5	0.126 3	0.045 7	0.071 1	0.046 5	0.038 3	0.054 9	0.118 5	0.053 0	0.072 1	0.044 7	0.063 4	0.022 2	0.000 0	0.937 5	0.927 9	0.976 9	0.946 0	0.970 6
16	0.098 9	0.046 5	0.126 3	0.061 4	0.087 7	0.062 5	0.054 0	0.054 9	0.082 2	0.053 0	0.072 1	0.044 7	0.079 9	0.053 0	0.062 5	0.000 0	0.960 7	0.928 9	0.946 0	0.952 3
17	0.075 7	0.055 5	0.121 4	0.070 4	0.098 3	0.055 5	0.063 0	0.047 9	0.095 3	0.045 5	0.048 8	0.052 7	0.090 6	0.077 7	0.072 1	0.039 3	0.000 0	0.935 6	0.937 0	0.931 3
18	0.073 9	0.071 1	0.118 6	0.053 8	0.080 0	0.054 9	0.046 4	0.063 5	0.092 5	0.061 1	0.064 4	0.052 6	0.089 1	0.045 4	0.023 1	0.071 1	0.064 4	0.000 0	0.937 6	0.962 9
19	0.072 0	0.022 8	0.080 7	0.022 4	0.046 4	0.054 0	0.061 6	0.030 7	0.107 7	0.029 7	0.063 0	0.021 9	0.087 4	0.029 7	0.054 0	0.054 0	0.063 0	0.062 4	0.000 0	0.978 1
20	0.077 1	0.029 4	0.085 5	0.014 5	0.037 1	0.044 7	0.036 9	0.052 6	0.111 6	0.021 8	0.068 7	0.014 4	0.060 6	0.007 2	0.029 4	0.047 7	0.068 7	0.03 71	0.021 9	0.000 0

3 讨论

多态位点多少即遗传相似率高低与群体遗传纯度有一定关系,张家口坝上高背鲫鱼群体由于环境封闭,没有外来品种引起的杂交现象,近亲繁殖,基因纯和程度较高,种群内遗传多样性低也就不足为奇。

遗传多样性与种群的适应能力、生存能力和进化潜力密切相关,一般认为种群的遗传多样性越丰富,其适应能力、生存能力和进化潜力就越大;遗传多样性的降低可导致其适应能力、生存能力降低,物种退化,极端情况下甚至威胁物种生存^[17-18],但三倍体鲫鱼是其对特殊环境的一种适应结果^[19-20]。该试验鲫鱼是一种三倍体鲫鱼,其为适应张家口坝

上冬季冰封期长达 5~6 个月的高寒环境,进化出调节生理活动的特殊机制(如在结冰 1 m 深的水面下极其缺氧的环境条件下仍能存活;生长快;群体补充迅速等等),封闭的环境使在特殊环境下进化得到的优良品质得以保存。因此,在良种选育时可以利用不同水域的品种进行基因的杂交优选,既保留原种的优良品种,又能增加适应能力、生存能力。

本次调查发现,由于环境变化、过度捕捞等因素,张家口坝上高背鲫鱼的资源量呈明显下降趋势,群体组成出现低龄化现象,本研究为其遗传多样性受多因素影响程度的分析研究提供了原始数据。为了有效保护和合理利用张家口坝上高背鲫鱼的种质资源,应采取适当措施,保护其幼鱼和产卵群体,使该鱼自然资源尽快恢复。

参考文献:

- [1] 曾珍,刘至治,潘连德,等. 松江鲈鱼野生群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化[J]. 动物学研究, 2012,33(2):203-210.
- [2] 何勇,安苗,李兴美. 贵州三种野生裂腹鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 贵州师范学院学报, 2012, 28(3):10-13.
- [3] 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,等. 人工复合四倍体异育银鲫雌核发育生殖方式的初步证明[J]. 科学通报, 1992,37(9):836-838.
- [4] 陈友明,陈校辉,潘莹,等. 江黄颡(♀)和乌苏里拟鲿(♂)及其杂交子代遗传变异的 RAPD 分析[J]. 上海海洋大学学报, 2010,19(1):12-18.
- [5] 汪留全,胡王. 我国的鲫鱼品种(系)资源及其生产性能的初步分析[J]. 安徽农业科学, 1997,25(3):287-289.
- [6] 王广银,丁文勇,陈少波,等. 浙闽香鱼 4 个群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 科技通报, 2011, 27(6): 863-868.
- [7] 宋平,周伟,潘云峰,等. 普通鲫鱼的 RAPD 标记及其遗传多样性[J]. 武汉大学学报:自然科学版, 2000, 46(6): 721-725.
- [8] 罗静,张亚平,朱春玲,等. 鲫鱼遗传多样性的初步研究[J]. 遗传学报, 1999,26(1):28-36.
- [9] 贾智英,石连玉,刘晓峰,等. 黑龙江水系不同倍性鲫鱼的遗传多样性[J]. 遗传, 2008, 30(11): 1459-1465.
- [10] 权娅茹,张本. RAPD 技术在我国鱼类研究中的应用[J]. 生物学通报, 2005,40(2):15-17.
- [11] 何舜平,汪亚平,陈宜瑜. 五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论稀有鮡鲫的系统位置[J]. 水生生物学报, 1997,21(3):262-266.
- [12] 王剑伟,王伟,崔迎松. 野生和近交稀有鮡鲫的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000,8(3):241-247.
- [13] 王晓梅,宋文芹,李秀兰,等. 鲫鱼种群的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2):26-28.
- [14] 张涛,路宏朝. 汉江上游鲫鱼 RAPD 遗传多样性研究[J]. 贵州农业科学, 2010,38(1):116-118.
- [15] 安进才. 坝上高背鲫[J]. 河北渔业, 1996(3):42.
- [16] 王秀芳,高培宇. 坝上高背鲫池塘无公害高产技术[J]. 渔业致富指南, 2007(13):27.
- [17] 季维智,宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1999.
- [18] 马春艳,刘敏,马凌波,等. 长江口刀鲚遗传多样性的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析[J]. 海洋水产研究, 2004,25(5):19-24.
- [19] Yang L, Gui J F. Positive selection on multiple antique allelic lineages of transferrin in the polyploid *Carassius auratus* [J]. Mol Biol Evol, 2004, 21(7):1264-1277.
- [20] 鲁翠云,杨彦豪,佟广香,等. 同水体银鲫与普通鲫遗传多样性的比较研究[J]. 水产学杂志, 2006, 19(2):42-50.

(编辑:张月清)