

杜 民,牛宝珍,刘艳红,等. 2个鲤鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):47-49.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.014

2个鲤鱼群体遗传多样性的 RAPD 分析

杜 民,牛宝珍,刘艳红,钱红金

(红河学院/云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室,云南蒙自 661199)

摘要:从 50 条随机引物中筛选出 10 条有效引物,采用 RAPD 技术对蒙自响水河和草坝的 2 个鲤鱼群体进行遗传多样性分析。结果表明:在 2 个群体中分别检测到 47、53 个位点,多态位点分别为 44、51 个,平均多态位点比例分别为 93.61% 和 96.23%;利用 Popgene version1.32 软件分析获得 2 个鲤鱼群体 Shannon 信息指数 (I) 分别为 0.479 9 和 0.455 7, Nei's 基因多样性指数 (H) 分别为 0.328 7 和 0.298 4, 等位基因观察数 (N_a) 分别为 1.821 4 和 1.910 7, 有效等位基因数 (N_e) 分别为 1.584 3 和 1.487 9, 群体间的遗传相似性系数为 0.958 1, 遗传距离为 0.041 9。2 个鲤鱼群体间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.082 4, 表明群体间的遗传变异占总的遗传变异的 8.24%, 群体内的遗传变异占总变异的 91.76%。

关键词:鲤鱼;RAPD;遗传多样性

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0047-03

自从随机扩增多态性 DNA 技术(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)于 1990 年由美国科学家 Williams 等和 Welsh 等分别建立起来^[1-2]以后,已在遗传多样性的检测、物种分类和演化、品种鉴定、种群的亲缘关系、构建鱼类遗传连锁图谱、鱼类育种和杂种优势等研究方面得到应用并且效果良好。陈国生应用 RAPD 技术分析了闽江中上游黑脊倒刺鲃和黄颡鱼遗传多样性^[3]。赵凯利用 RAPD 技术对 4 种鲤科鱼类的基因组 DNA 进行了分析,结果表明鲤亚科 2 种鱼种间相似性明显高于青海湖裸鲤和草鱼种间的相似性,然而另外 2 个鲤亚科 3 种鱼与裂腹鱼亚科的青海湖裸鲤之间的差异显著高于鲤亚科鲤与雅罗鱼亚科草鱼、鲫鱼之间的差异^[4]。

鲤鱼(*Cyprinus carpio*)属硬骨鱼纲(Osteichthyesu)辐鳍亚纲(Actinopterygii)鲤形总目(Cyprinomopha)鲤科(Cyprinidae),是一种最常见的淡水鱼,在各个淡水水域均有分布,也是我国淡水养殖的主要经济鱼之一。天然水域的污染和过度捕捞利用等原因造成鲤鱼栖息环境严重破坏,因此了解并保护鲤鱼种质资源显得极为迫切。本研究利用 RAPD 方法对云南省蒙自市响水河和草坝水体的 2 个鲤鱼群体进行分子遗传分析,探讨其遗传多样性,为鲤鱼资源的科学管理和合理开发提供理论依据。

1 材料与与方法

收稿日期:2014-03-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360638);云南省教育厅科学研究基金重大专项(编号:ZD2013009);红河学院中青年学术带头人后备人才项目(编号:2014HB0203);红河学院博士专项(编号:14BS11)。

作者简介:杜 民(1974—),男,湖北枣阳人,博士,副教授,主要从事水生生物技术与资源研究。Tel:(0873)3799787;E-mail:du2005min@126.com。

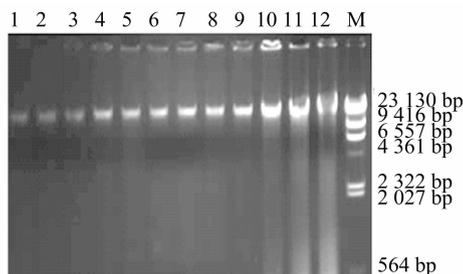
通信作者:刘艳红,博士,教授,主要从事水域资源与环境管理政策研究。Tel:(0873)3698575;E-mail:kidliu1968@126.com。

1.1 材料

供试鱼来自于云南省蒙自市草坝水体和响水河水库,每个水体各采集 6 尾。取活鱼的尾鳍分别装入 1.5 mL 离心管中,加入无水乙醇并于 4 °C 保存备用。

1.2 方法

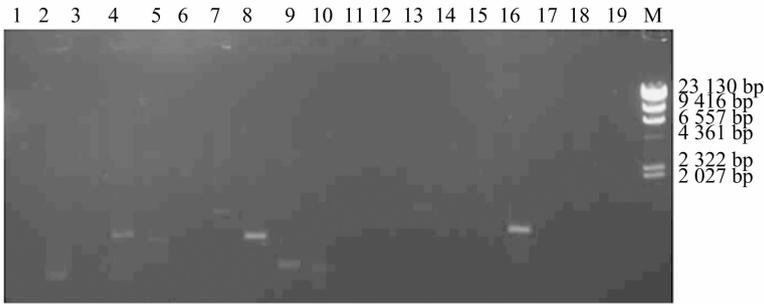
1.2.1 试剂、仪器及基因组 DNA 提取 Taq 酶、dNTP、Marker 及 10 × Buffer(博迈德生物科技公司);Tris 酚(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);PCR 仪:EDC-810(东胜创新生物技术有限公司);紫外透射仪:DYY-11(北京六一仪器厂);高速离心机:HC-2062(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。参照杜民等的方法^[5]提取鲤鱼基因组总 DNA 并放于 -4 °C 冰箱。取 5 μL DNA 样品和适量溴酚蓝充分混匀后,利用 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统进行检测,观察到鲤鱼基因组 DNA 条带比较清晰,符合 RAPD 实验要求(图 1)。



泳道 1 至 6 分别为蒙自响水河水库的鲤鱼个体 DNA; 7 至 12 分别为蒙自草坝的鲤鱼个体 DNA; M 为 marker

图 1 鲤鱼基因组 DNA 电泳图

1.2.2 引物筛选及 RAPD 检测 参照郭勇等三叶崖爬藤 RAPD 引物筛选^[6]。以 12 尾鲤鱼的混合 DNA 为模板,从 50 条长度分别为 10 bp 的随机引物中(部分引物筛选的结果如图 2 所示),筛选出能扩增出清晰、条带数量适中的 10 条引物用于扩增(表 1)。RAPD 扩增反应程序:94 °C 预变性 2 min; 然后 35 个循环(94 °C 变性 30 s, 36 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸



M为 marker; 从右到左各编号对应的引物分别为SBSA01、SBSA02、SBSA06、SBSA09、SBSA13、SBSB03、SBSB06、SBSB07、SBSB08、SBSB09、SBSB10、SBSB13、SBSB14、SBSB19、SBSC05、SBSC07、SBSC08、SBSC09、SBSB02

图2 部分引物筛选电泳图

表1 10条随机引物的序列

引物	序列	引物	序列
SBSA10	GTGATCGCAG	SBSC01	TTCGAGCCAG
SBSA16	AGCCAGCGAA	SBSC02	GTGAGCGGTC
SBSB05	TGCGCCCTTC	SBSC04	CCGCATCTAC
SBSB07	GTGACGCAG	SBSC07	GTCCCACGCA
SBSB08	GTCCACACGG	SBSC08	TGGACCGGTG

2 min);最后 72 °C 延伸 5 min。取 5 μL 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳,5 V/cm 电压;用凝胶成像系统进行扫描和分析。
 1.2.3 数据统计分析 记录清晰、明亮且重复性好的条带。将相同迁移距离的条带看作同一位点,统计总条带数与多态性条带数。根据产物的电泳带型,在相同迁移率上出现带的记为 1,未出现带的记为 0,只记录清晰且重复性好的 DNA 条带,并计算相关参数。根据 Nei 指数法^[7]用 Popgene1.32 软件对 2 个鲤鱼群体的遗传多样性指数进行分析:(1)多态位点百分率 = 多态位点数/所测位点总数 × 100%;(2)遗传相似系数: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_{xy} 为 2 群体的共享位点数, N_x 为 1 群体的位点数, N_y 为 2 群体的位点数;遗传距离 $P: P = 1 - F$;(3)基因流 $N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$;(4)遗传分化

指数 $G_{st} = (H_t - H_{pop}) / H_t$, 其中 H_t 为总群体的平均多样性, H_{pop} 为各群体多样性的平均值。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

用筛选到的 10 条引物对 2 个鲤鱼群体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,表 2 列出了 10 条引物序列的扩增情况。本试验 2 个群体中共扩增出 100 个位点,其中响水河鲤鱼群体总条带数为 47 条,其中多态性条带有 44 条,平均多态位点比例为 93.61%;草坝鲤鱼群体总条带数为 53 条,其中多态性条带有 51 条,平均多态位点比例为 96.23%,表明该群体遗传资源丰富,具有较好的遗传多样性。

2.2 2 个鲤鱼群体的遗传多样性

2 个鲤鱼群体多样性指数见表 3。响水河鲤鱼群体和草坝鲤鱼群体 Shannon 信息指数 (I) 分别为 0.479 9 和 0.455 7; Nei's 基因多样性指数 (H) 分别为 0.328 7 和 0.298 4; 等位基因观察数 (N_e) 分别为 1.821 4 和 1.910 7,有效等位基因数 (N_e) 分别为 1.584 3 和 1.487 9。响水河鲤鱼群体的 Shannon 信息指数 (I) 高于草坝鲤鱼群体的 Shannon 信息指数。

表2 10条 RAPD 引物对 2 个鲤鱼群体的扩增结果

引物	序列	总条带数(条)		多态性条带数(条)		多态性频率(%)	
		响水河	草坝	响水河	草坝	响水河	草坝
SBSA10	GTGATCGCAG	0	5	0	5	0	100
SBSA16	AGCCAGCGAA	6	6	6	5	100	88.33
SBSB05	TGCGCCCTTC	4	3	1	3	75	100
SBSB07	GGTGACGCAG	6	5	6	5	100	100
SBSB08	GTCCACACGG	6	6	6	5	100	88.33
SBSC01	TTCGAGCCAG	5	6	5	6	100	100
SBSC02	GTGAGCGGTC	5	5	5	5	100	100
SBSC04	CCGCATCTAC	5	5	5	5	100	100
SBSC07	GTCCCACGCA	6	6	6	6	100	100
SBSC08	TGGACCGGTG	4	6	4	6	100	100
合计		47	53	44	51	93.61	96.23

表3 2个鲤鱼群体多样性指数

群体	Shannon 信息指数	Nei's 基因多样性
响水河	0.479 9	0.328 7
草坝	0.455 7	0.298 4
总的	0.515 5	0.341 7

2.3 群体间的遗传变异分析

根据总的基因多样性 (H_t) 和群体内基因多样性 (H_s) 可以推算出群体间分化水平 (G_{st})。本研究的 2 个鲤鱼群体间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.082 4,即群体间的遗传变异占总遗传变异的 8.24%,群体内的遗传变异占总变异的 91.76%,显

示出 2 个群体间不存在明显的遗传变异(表 4)。

表 4 2 个鲤鱼群体遗传分化与基因流

指标	总的基因多样性(H_t)	群体内基因多样性(H_s)	遗传分化系数(G_{st})	基因流(N_m)
平均	0.341 7	0.313 5	0.082 4	5.569 0
标准差	0.015 6	0.014 9		

2.4 群体间的遗传关系分析

依据 10 个有效引物进行 PCR 扩增的结果,计算出 2 种鲤鱼群体间的遗传相似性指数和遗传距离如表 5 所示。响水河和草坝 2 个群体的遗传相似性系数为 0.958 1,遗传距离为 0.041 9。

表 5 2 个鲤鱼群体间的相似性(右上角)和遗传距离(左下角)

群体	响水河	草坝
响水河	****	0.958 1
草坝	0.041 9	****

3 讨论

3.1 2 个鲤鱼群体的遗传多样性

RAPD 标记操作简单、方便、快速并且引物具有随机性^[8-9],现已广泛应用于水生经济动物的遗传多样性研究,如张涛等对汉江上游鲫鱼研究其多态位点比例为 67.77%^[10];方耀林等对长江水系的 3 个青鱼群体进行研究,结果表明多态性位点比例为 75%^[11];励迪平等报道曼氏无针乌贼的多态性位点比例为 14.6%,平均杂合度 H_o 为 0.032^[12],所得出的曼氏无针乌贼的遗传多样性是比较低的;朱学峰研究发现广西中华草龟的多态位点比例为 66.29%,广西中华草龟的遗传多样性比较丰富,但是个体间的亲缘关系比较近,遗传变异程度很小^[13];张伟等对东南太平洋智利竹筴鱼研究发现多态位点比例为 98.08%,Nei's 基因多样性指数为 $0.350 0 \pm 0.144 0$,群体的 Shannon 信息指数为 $0.520 2 \pm 0.181 3$,遗传分化指数 G_{st} 为 0.031 1,结果表明该海域智利竹筴鱼群体的遗传多态性比较高,但群体间不存在明显的遗传分化^[14];张学明等研究发现北海文昌鱼 Shannon 信息指数为 $0.219 0$ ^[15]。本试验筛选出 10 条引物进行 PCR 扩增,利用 RAPD 技术对响水河和草坝鲤鱼群体进行遗传多样性分析,表明 2 个群体的平均多态位点比例分别为 93.61% 和 96.23%,Shannon 信息指数分别为 0.479 9、0.455 7,表明响水河和草坝 2 个鲤鱼群体遗传多样性比长江铜鱼、武汉市场购回的普通鲫鱼、汉江上游鲫鱼、长江水系青鱼、曼氏无针乌贼、广西中华龟的遗传多样性丰富,但没有东南太平洋智利竹筴鱼遗传多样性丰富。

3.2 2 个鲤鱼群体之间的遗传差异

Thorpe 研究认为,同种不同群体间遗传距离 D 在 0.03 ~

0.2 之间,遗传相似度(I) 在 0.80 ~ 0.97 之间,不同物种间遗传相似度(I) 在 0.2 ~ 0.8 之间^[16]。本研究中,2 个鲤鱼群体间的基因分化系数 G_{st} 为 0.082 4,表明 8.24% 的遗传变异来自于群体间,群体内的遗传变异占总变异的 91.76%,这说明这 2 个区域群体之间不存在显著的遗传分化,但不同群体间存在一定的遗传分化。响水河和草坝 2 个鲤鱼群体的遗传相似度较高(0.958 1),遗传距离 D 为 0.042 9,大于 0.03 小于 0.2,表明 2 个群体间存在一定的遗传分化。本研究获得的遗传多样性数据可以对今后红河州鲤鱼遗传变异水平及其变化趋势分析提供参考。

参考文献:

- [1] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531 - 6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213 - 7218.
- [3] 陈国生. 应用 RAPD 技术分析闽江中上游黑脊倒刺鲃和黄颡鱼遗传多样性[J]. *现代渔业信息*, 2011, 26(5): 9 - 11, 17.
- [4] 赵 凯. 青海湖裸鲤与鲤、鲫、草鱼的随机扩增多态 DNA 分析 [J]. *淡水渔业*, 2001, 31(5): 49 - 51.
- [5] 杜 民, 尹绍武, 刘艳红, 等. 4 种裸胸鱧的分子遗传多样性和亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. *海洋通报*, 2013, 32(3): 321 - 327.
- [6] 郭 勇, 卢华兵, 石丽敏, 等. 三叶崖爬藤 DNA 提取及 RAPD 引物筛选 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(8): 39 - 40.
- [7] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583 - 590.
- [8] 高 璐, 唐伟, 杨振泉, 等. 江苏省淡水产品中主要弧菌菌群的 RAPD 分型 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(3): 599 - 605.
- [9] 代文娟, 黎乾坤, 骆文华, 等. 狭叶坡垒迁地保护种群的 RAPD 多样性分析 [J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(11): 39 - 41.
- [10] 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.
- [11] 方耀林, 余来宁, 许晓芳, 等. 长江水系青鱼遗传多样性的研究 [J]. *湖北农学院学报*, 2004, 24(1): 26 - 29.
- [12] 励迪平, 王春琳, 朱 悦. 曼氏无针乌贼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *水利渔业*, 2008, 28(4): 21 - 24.
- [13] 朱学峰. 广西中华草龟遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *南方农业学报*, 2011, 42(9): 1148 - 1150.
- [14] 张 伟, 张 敏, 邹晓荣, 等. 东南太平洋智利竹筴鱼 RAPD 遗传多样性研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(1): 22 - 26.
- [15] 张学明, 黎明星, 张 立, 等. 北海文昌鱼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *南方农业学报*, 2011, 42(4): 432 - 436.
- [16] Thorpe J P. The molecular clock hypothesis; biochemical evolution, genetic differentiation and systematics [J]. *Annu Rev Ecol Sys*, 1982, 13(1): 139 - 168.