研究简报

黄颡鱼与长须黄颡鱼种间的 RAPD 标记

周秋白[1,2] 李风波[2] 周 莉[2] 桂建芳[2]
(1. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045;
2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

RAPD MARKERS BETWEEN YELLOW CATFISH PELTEOBAGRUS FULVIDRACO AND LONG YELLOW CATFISH PELTEOBAGRUS EUPOGON

ZHOU Qiu-Bai[1,2], LI Feng-Bo[2], ZHOU Li[2] and GUI Jian-Fang[2]
(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: 黄颡鱼; 长须黄颡鱼; 遗传鉴定; RAPD
Key words: P. fulvidraco (Richardson); P. eupogon (Boulenger); Genetic identification; RAPD
中图分类号: Q173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)04-0482-04

黄颡鱼属(Pelteobagrus Bleeker, 1865)属鲇形目(Siluriformes), 科(Bagridae)。黄颡鱼属在中国已知有 5 种: 长须黄颡鱼(Pelteobagrus eupogon Boulenger), 黄颡鱼(P. fulvidraco Richardson), 中间黄颡鱼(P. intermedius Nichols et Pope). 瓦氏黄颡鱼(P. vachelli Richardson), 光泽黄颡鱼(P. nitidus Sauvage et Dabry)。黄颡鱼属的种类常统称"黄颡鱼", 除中间黄颡鱼外, 均是国内江河湖泊常见的经济鱼类, 在长江、黄河、珠江及黑龙江诸流域和海南岛均有其中的种类分布。因其具有肉质细嫩, 肉味鲜美, 营养丰富, 无肌间刺等优点, 颇受广大消费者欢迎。近年来, 由于天然水域滥捕现象严重, 水域环境受污染程度加剧等因素, 黄颡鱼资源受到一定程度的破坏, 为保护黄颡鱼资源进行相关的研究势在必行。鉴于黄颡鱼属的种类形态近似不易区分, 有关形态分类系统的书籍虽有分类特征标准, 但是长须黄颡鱼与黄颡鱼一样, 胸鳍棘前后缘均具细小锯齿, 其体色易随环境不同而发生变化, 因此在具体操作中对种类准确鉴别较难。黄颡鱼是黄颡鱼属的习见种, 个体大、适应性强、分布广。研究表明 1 龄以上的雄性黄颡鱼生长速度显著快于雌鱼[1]。其养殖、营养需求及人工繁殖技术也有报道[2]。为获得雄性鱼苗, 通过雌核发育和转性技术生产全雄黄颡鱼方法目前也已处于探索阶段。因此, 建立简单、准确的黄颡鱼分子水平的鉴别方法, 对黄颡鱼的亲本选择和养殖生产有着重要意义。童芳芳等用 RAPD 和 SCAR 复合分子标记曾对湖北境内采集的光泽黄颡鱼、黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼种类鉴别作过研究[3], 但对黄颡鱼与长须黄颡鱼的分子水平的种间鉴别尚未见报道。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)[4]为一种快速、简便进行遗传标记和遗传多样性分析的方法, 其标记的数目和所揭示的信息量大大超过同工酶和 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)分析法, 现今已有许多这方面的研究报道[5,6], 本文采用 RAPD 技术对黄颡鱼和长须黄颡鱼种质鉴别进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1.1 实验用鱼及生化试剂 黄颡鱼、长须黄颡鱼均取自江西鄱阳湖的珠港堤外。捕捞的黄颡鱼依据普通生物学特征在实验室分类。黄颡鱼、长须黄颡鱼雌、雄分别各取 10 尾鱼的尾鳍。尾鳍用无水酒精固定保存备用。随机引物购自上海生工生物工程公司。生化试剂琼脂糖(Agarose)西班牙进口, Taq 酶、10@buffer 购自华美生物公司; dNTP、DNA Marker 购自宝生生物工程(大连)公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 DNA 提取、RAPD 反应及其产物的检测 DNA 抽提材料取自酒精固定保存的鱼尾鳍, 样品单个处理。参照标准

收稿日期: 2005-10-24; 修订日期: 2005-11-30
基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2004CB117405)资助
作者简介: 周秋白(1965-), 男, 汉族, 江西修水人。主要从事鱼类繁育与营养方面的研究
通讯作者: 桂建芳, jfgui@ihb.ac.cn

酚2氯仿程序进行。基因组 DNA 以 DNA Marker DL2000 为标准, 在 1l0% 琼脂糖凝胶进行电泳测定其浓度和纯度, 将提取的 DNA 样品定量至等质量浓度 20ng/ LL。

PCR 反应体系与条件。反应总体积 25LL, 10@PCR 缓冲液含($MgCl_2$) 2l 0LL, 模板 DNA(20ng) 1LL, 引物 0l 2Lmol/ L, dNTP(10mmol/ L) 0l 25LL, DNA 聚合酶(Taq 酶) 1U, 余加纯水达到 25LL。按照上述条件反应混合物于 PCR 仪上进行扩增反应。扩增反应参数为: 94e 预变性 4min; 94e 变性 40s; 38e 退火 1min; 72e 链延伸 1min30s; 循环数为 40; 最后在 72e 下延伸 7min。PCR 扩增产物用浓度为 1l2% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 电泳(8V/ cm), 电泳凝胶用含溴化乙啶 EB (0l 5Lg/ mL)染色, 然后在紫外灯下观察拍照检测。扩增片段大小通过与宝生生物 DNA Marker DL2000 比较估计。

113　RAPD 标记引物的筛选　分别用黄颡鱼和长须黄颡鱼基因组 DNA 池为模板进行 RAPD 引物筛选, 选取两种鱼的扩增效果均重复性好、带型清晰明亮的引物, 作为黄颡鱼和长须黄颡鱼 RAPD 标记引物。

114　遗传多样性分析　采用扩增多态性较好的 10 对引物对鄱阳湖黄颡鱼群体和长须黄颡鱼群体进行 RAPD 扩增。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, 多态性条带数, 根据 RAPD 产物的电泳带型, 在相同的迁移率上出现带的记为 1, 没有出现带的记为 0。将所有个体的 RAPD 类型转换成二元数据矩阵。依据 D= 1- S= 1- 2Nxy/ (Nx+ Ny), 其中 S 为遗传相似率, Nx 为样品 x 具有带的条数, Ny 为样品 y 具有带的条数, Nxy 为两样品共有带的条数; 用 RAPDinstance(1104)程序计算各样品间的 Nei& Li 氏遗传距离 D(Genetic distance)[7]; 利用 Nei & Li 氏遗传距离, 采用 PHYLIP315C 软件包的 Neighbour 程序按非加权平均法 UPGMA 方法(Unweighted pair group method using arithmetic averages) 进行聚类分析。

2　结果

211　RAPD 扩增及黄颡鱼和长须黄颡鱼的 RAPD 标记

分别用黄颡鱼和长须黄颡鱼基因组 DNA 池为模板进行 RAPD 引物筛选, 获得扩增条带清晰、重复性好, 具有较明显种间特异性引物 19 对(表 1), 每对引物所扩增出来的 DNA 条带数从 1 到 10 条不等, 扩增的 DNA 条带大多分布在 200) 2000kb之间。如, S475 扩增结果: 黄颡鱼在 750bp 左右出现一条特异性条带, 长须黄颡鱼无, 但在 350bp 处长须黄颡鱼出现一条强带, 黄颡鱼无(图 1. A); S483 扩增结果: 黄颡

表 1　随机引物及其扩增状况

Tabl 1　Random primer and their amplication

引物编号 No. of primer	引物序列 Primer sequence	扩增条带数 Applicons		引物编号 No. of primer	引物序列 Primer sequence	扩增条带数 Applicons		引物编号 No. of primer	引物序列 Primer sequence	扩增条带数 Applicons	
		Pf	Pe			Pf	Pe			Pf	Pe
S311	GGAGCCTCAG	6	3	S475	GGAAGCCAAC	6		S498	ACGCTGGGTG	8	8
S312	TCGCCAGCCA	5	7	S476	CCAAGCTGCC	8	5	S502	CACAGCTGCC	8	7
S313	ACGGGAGCAA	4	5	S477	TGACCCGCCT	4	4	S1006	GTAAGCCCCT	5	8
S447	CAGCACTGAC	6	7	S479	GGGAAGGACA	8	6	S1028	AAGCCCCCCA	10	6
S450	TCAGAGCGCC	2	4	S481	GGGACGATGG	6	5	S1031	ACGGCGATGA	7	7
S486	GAGCGCCTTG	4	3	S483	GGTCACCTCA	4	1	S1035	GACACAGCCC	10	7
S495	GGGTAACGTG	8	9								

注: Pf: 黄颡鱼, Pe: 长须黄颡鱼(下同); Pf: yellow catfish P. fulvidraco; Pe: long yellow catfish P. eupogon(so in the following)

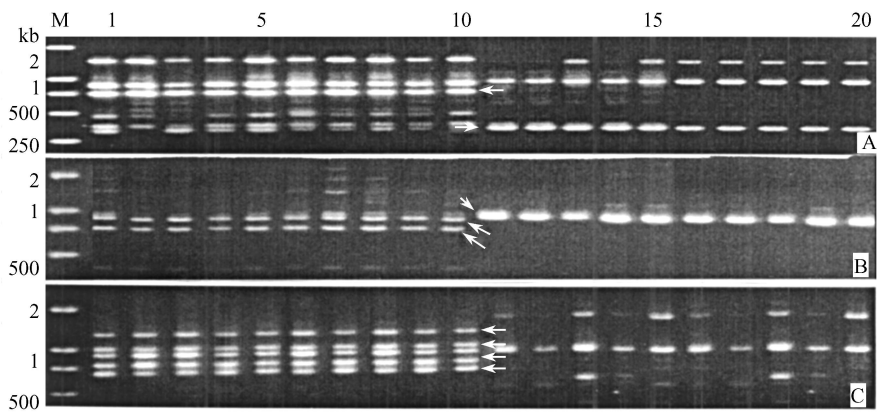


图 1　3 对(A. S475、B. S483、C. S1006)引物扩增图谱

Fig. 1　Application patterns of three random primer(A. S475, B. S483, C. S1006)

1) 101 黄颡鱼个体 DNA 为模板; 11) 201 长须黄颡鱼个体 DNA 为模板　1) 101 The application of each primer use DNA of P. fulvidraco as templet; 11) 201 The application of each primer use DNA of P. eupogon as templet

鱼 750bp 和 850bp 左右出现两条特异带, 长须黄颡鱼无, 而长须黄颡鱼仅在 1kb 出现一条强带(图 1. B); S1006 扩增结果: 在 800bp 左右黄颡鱼和长须黄颡鱼出现相似扩增条带, 黄颡鱼在 1500bp、1100bp、750bp、700bp 出现特异扩增带, 长须黄颡鱼无; 而长须黄颡鱼大部分个体在 1800bp、600bp 出现一条扩增带, 而黄颡鱼无(图 1. C)。

2.2 黄颡鱼和长须黄颡鱼的遗传多样性

10 对引物扩增鄱阳湖黄颡鱼和长须黄颡鱼, 在黄颡鱼群体中共检测到 76 个位点, 其中 14 个为多态位点, 多态位点占总位点数 18.4%。其群体 Nei & Li 氏遗传距离 0.0667 ± 0.0239, 在长须黄颡鱼群体中共检出 63 个位点, 其中多态位点 17 个, 多态位点占总位点数 27.0%, 其群体 Nei & Li 氏遗传距离为 0.0938 ± 0.0299。黄颡鱼与长须黄颡鱼种间遗传距离为 0.5839 ± 0.0341(表 2)。

表 2 两种黄颡鱼种内及种间平均遗传距离

Tabl 2 The average genetic distances among and between the two species of P. fulvidraco and P. eupogon

	Pf	Pe
Pf	0.0667 ± 0.0239	
Pe	0.5839 ± 0.0341	0.0938 ± 0.0229

2.3 聚类分析

黄颡鱼与长须黄颡鱼群体个体间亲缘关系聚类分析结果(图 2)。从图 2 可以看出每个种的所有个体分别聚成一支, 也就是说依据 RAPD 谱带分析可将两个种所有个体区分开来。

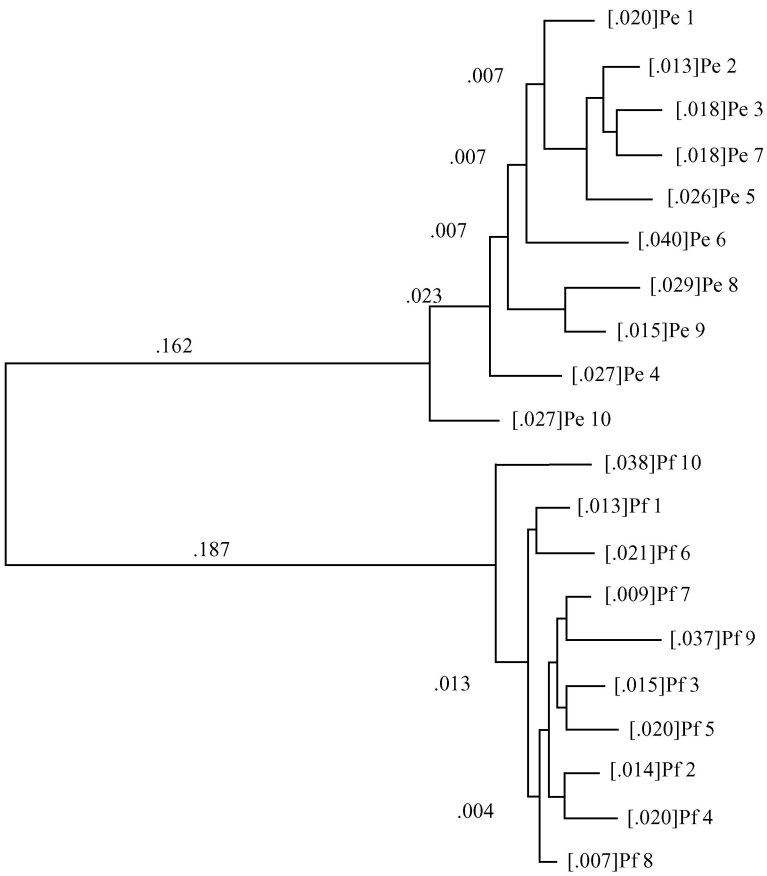


图 2 根据两种黄颡鱼共 20 个个体的扩增结果, UPGMA 聚类法构建的分支图

Fig. 2 Dendrogram of 20 individuals from two species of P. fulvidracoand P. eupogon obtained by UPGM analysis

3 讨论

一般认为 RAPD 技术存在一些缺陷, 稳定性和可重复性低, 对一些弱带的判读会对实验结果准确性造成一定的影响。从本实验结果来看在不同条件下不同个体之间、特别是不同种之间的差异性, 还是较稳定表现为主要条带基本一致, 聚类分析可将两个种明显区分。因此 RAPD 技术在黄颡鱼的分类鉴定或分子遗传育种等工作中有一定的价值。从实验结果来看多数引物对黄颡鱼与长须黄颡鱼种间扩增产生的条带差异较大。中国黄颡鱼属已知的 5 种鱼中, 有长须黄颡鱼; 黄颡鱼; 瓦氏黄颡鱼; 光泽黄颡鱼四种作过核型研究。黄颡鱼的核型沈俊宝等、洪云汉等均有过研究公认为 2N= 52, 瓦氏黄颡鱼、光泽黄颡鱼也为 2N= 52; 长须黄颡鱼与其他 3 种不同 2N= 50, 有 3 对明显大的染色体。虽然长须黄颡鱼与黄颡鱼形态上相似, 但染色体数量不同。从扩增结果来看黄颡鱼与长须黄颡鱼种间多数引物也确实产生差异较大的扩增条带。本实验采用的 RAPD 技术扩增条带结果经聚类分析鉴定的所有个体种属关系结果与形态分类方法鉴

定的结果一致。因此, 在实际工作中可通过剪少量尾鳍采用RAPD技术选择其中几对多态性好、带纹清晰、差异明显的引物进行分子水平的黄颡鱼分类鉴定。

关于RAPD研究时的取样数量问题, 根据Tajima的DNA序列抽样分布理论, 在DNA水平上估计群体变异时, 样品数量n= 10(甚至5)就可以了。因此, 只从黄颡鱼和长须黄颡鱼群体中每种随机选取10个个体用于本实验研究。

本实验大多数引物在种群内扩增条带接近, 多态性条带少。对于种群内遗传特性研究仅部分引物具有较好的特异性。一般所用引物越多其扩增DNA带愈多, 其基因组覆盖面愈大, 揭示的信息愈多, 鉴定或标记的结果会更准确。因此, 种内多样性分析应从更大的范围内进行特异引物的筛选。通过10对引物扩增鄱阳湖黄颡鱼和长须黄颡鱼, 种间的遗传差异程度比较大; 黄颡鱼群体内遗传多样性不高, 这和宋平等研究结果相似, 长须黄颡鱼群体相对于黄颡鱼群体多样性略高; 从聚类分析结果也可看出这一点。本研究获得的数据可以作为衡量黄颡鱼遗传变异的一种相对的指标, 并对今后鄱阳湖两种黄颡鱼的遗传变异水平及变化趋势的研究提供参考。

参考文献:

[1] Liu S P. A study on the biology of Pelteobagrus fulvidraco in Poyang Lake [J]. Chinese Journal of Zoology, 1997, (4): 10) 16[刘世平. 鄱阳湖黄颡鱼生物学的研究. 动物学杂志, 1997, (4): 10) 16]

[2] Zhou Q B, Wu H D, Wu H X, et al. A Study on the Protein Require2ment of Young Fish of Pelteobagrus fulvidraco(Richardson) [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis 2003, 25(3): 763) 765[周秋白, 吴华东, 吴红翔等. 黄颡鱼蛋白需求量的研究. 江西农业大学学报, 2003, 25(3): 763) 765]

[3] Tong F F, Tang M L, Yang X, et al. Species Authentication of Pel2teobagrus by mutiplex molecular marker RAPD and SCAR[J]. Acta Hydrobiology sinica 2005, 29(3): 465) 468[童芳芳, 汤明量, 杨星, 等. 用RAPD和SCAR复合分子标记对黄颡鱼属进行种质鉴定. 水生生物学报, 2005, 29(3): 465) 468]

[4] Williams J G K, Kubelik A R, Liavk K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. [J]. Nu2cleic Acids Res. 1990, 18(22): 6531) 6535

[5] Zhou L, Fan L, Gui J F. RAPD analysis of incorporation of hetergous genetic materials in multiple species of silver crucian carp. [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22(4): 301) 306[周莉, 樊连, 桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整入的RAPD分析. 水生生物学报, 1998, 22(4): 301) 306]

[6] Jia H B, Zhou L, Gui J F. RAPD marker analysis of two artifigyno2genetic populations in red2white ornamental carp[J]. Acta Hydroblogi2ca Sinica, 2002, 26(1): 1) 7[贾海波, 周莉, 桂建芳. 两个工雌核发育红白锦鲤群体的RAPD标记分析. 水生生物学报, 2002, 26(1): 1) 7]

[7] Nei M, Li W H. Mathematics mode for studying genetic variation in terms of restriction endorucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269) 5273