

丹江口水库赤眼鱧(*Squaliobarbus curriculus*)遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析*

杨太有¹ 关建义^{1,2} 陈宏喜¹ 汪亚平³

(1. 河南师范大学生命科学学院 新乡 453007; 2. 新乡医学院生命科学技术系 新乡 453003;
3. 中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

提要 利用 RAPD 和 ISSR 两种分子标记技术, 分析了丹江口水库野生赤眼鱧 30 个个体的遗传多样性。用 11 个 RAPD 引物对其基因组 DNA 进行扩增, 共获得 101 个重复性好且谱带清晰的扩增位点, 片段大小在 100—3000bp 之间, 其中多态性位点 63 个, 多态位点比例为 62.38%; 个体间遗传距离在 0.1049—0.3417 之间, 平均为 0.1742。用 10 个 ISSR 引物共检测到 88 个位点, 其中多态性位点 61 个, 多态位点比例为 69.32%; 个体间遗传距离在 0.1088—0.3847 之间, 平均为 0.1907。结果显示, 丹江口水库野生赤眼鱧群体的多态位点比例和平均遗传距离均较大, 说明其具有较高的遗传多样性。

关键词 赤眼鱧, 遗传多样性, RAPD, ISSR

中图分类号 Q346

赤眼鱧(*Squaliobarbus curriculus* Richardson)属鲤形目, 鲤科, 雅罗鱼亚科, 赤眼鱧属, 是重要的经济鱼类之一(伍献文, 1964)。该鱼具有肉质肥厚, 味道鲜美, 易于人工驯化养殖, 生长速度较快, 抗病力强, 耐缺氧, 适宜于高密度养殖及混养等特点。近年来, 作为新的养殖品种越来越受到人们的重视, 对其地理分布、生长和繁殖等生物学方面的研究已有报道(Fu *et al.*, 2003; 杨明生等, 2006; 孙际佳等, 2006; 龙光华等, 2005), 人工养殖与繁殖技术在我国也已经获得成功。但国内外对赤眼鱧遗传多样性的研究未见报道。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)是建立在 PCR 基础上的分子标记技术, 具有灵敏、快速、特异性强和检测容易等优点, 既有大量的随机引物可供选择, 又不受种属限制, 自该技术诞生以来, 已被广泛地应用于物种生物多样性、种属分类、亲缘关系分析和系统研究。ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)是由 SSR(Simple Sequence Repeat)发展而来的一种新的分子标记。该技术可以特异地扩增出微卫星区域及其相邻区域的 DNA 序列。相对于 RAPD 技术,

ISSR 技术有相当高的可重复性, 其实验的稳定性比较可靠(Qian *et al.*, 2001, Luis *et al.*, 2001), 现已广泛应用于动植物的种质鉴定和遗传多样性的分析。但在鱼类中的研究较少(许广平等, 2005; 张媛等, 2006; Maltagliati *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006)。本文利用 RAPD 和 ISSR 技术, 对丹江口水库野生赤眼鱧群体的遗传多样性进行分析, 旨在阐明其遗传多样性水平, 为其种质资源的评价、保护和合理利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用赤眼鱧(*Squaliobarbus curriculus*)于 2006 年 8 月分别在丹江口水库汉江库区的肖川和丹江库区的香花和马蹬采集, 共 30 尾, 均为野生。取背部肌肉, 用液氮贮存运回实验室, -70 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取与定量

取 0.5g 肌肉提取基因组 DNA, 方法参考 Sambrook 等(1995), 略有改动。提取后的 DNA 用

* 河南省科技攻关项目资助, 0524030005 号; 河南省动物学重点学科资助项目, 200602 号。杨太有, 副教授, E-mail: yang-taiyou@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-28, 收修改稿日期: 2007-03-18

0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用紫外分光光度计检测其浓度和纯度,调整浓度至 30ng/ μ l, 4 保存备用。

1.3 RAPD 扩增及其产物检测

RAPD 随机引物购自上海生工生物工程技术公司,采用 S 系列的两组引物(S101—S120, S1101—S1120)。PCR 扩增反应体系为:总反应体积 25 μ l, 内含 10 \times Taq Buffer (Mg^{2+} free) 2.5 μ l, 25mmol/L Mg^{2+} 2.0 μ l, 10mmol/L dNTPs 0.5 μ l, 10 μ mol/L Primer 1 μ l, 5U/ μ l Taq 酶 0.2 μ l, 30ng/ μ l 模板 DNA 1 μ l。用 Biometra PCR 仪进行扩增,程序为 95 预变性 5min, 然后按 94 变性 30s, 36 退火 45s, 72 延伸 90s 进行 38 个循环,最后 72 终延伸 10min, 4 维持。设有不加模板的空白对照。扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳,0.5 μ g/ml 溴化乙锭染色。上样量 12 μ l, 其中上样缓冲液 2 μ l, 扩增产物 10 μ l。用 ChampGel-1000 型数码凝胶图像分析仪紫外检测并成像。

1.4 ISSR 扩增及其产物检测

ISSR 引物(ISSR-1—ISSR-77)购自南京生兴生物技术有限公司。除 30ng/ μ l 的模板 DNA 加 1.5 μ l 外, ISSR-PCR 扩增反应体系与 RAPD-PCR 扩增反应体系相同。扩增程序为 95 预变性 5min, 然后进入 PCR 循环,即 94 变性 45s, 52 退火 40s, 72 延伸 90s, 共 38 个循环;循环结束后 72 终延伸 7min, 4 保存。设有不加模板的空白对照。扩增产物检测同 RAPD 扩增产物检测。

1.5 数据分析

RAPD 与 ISSR 都是显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为属于同一位点(钱韦等,2001)。扩增阳性记为 1, 扩增阴性记为 0, 形成 RAPD 和 ISSR 表型数据矩阵,对下列参数进行统计分析。

(1) 多态位点比例: $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$ 。

(2) 个体间遗传相似度(Nei, 1978): $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。 N_x 和 N_y 分别为第 x 和 y 个体拥有的 DNA 扩增的阳性标记数, N_{xy} 是 x 、 y 两个个体共有的阳性标记数。群体内的遗传距离 $D = 1 - S$, S 是群体内所有的两个个体间相似系数的平均值。群体内的遗传距离利用 TFPGA 软件统计。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果分析

从 40 个 RAPD 随机引物中,筛选出扩增重复性好、条带清晰且多态性高的 11 个引物,对 30 个赤眼鲟样本的基因组 DNA 进行扩增,结果如表 1。共检测出 101 个位点,片段大小在 100—3000bp 之间。每个引物检测到的位点数从 7—11 不等,平均每个引物可检测到的位点数为 9.2 个。其中多态位点为 63 个,多态位点比例为 62.38%。个体间的遗传距离为 0.1049—0.3417, 平均为 0.1742。图 1 为引物 S112 和 S1107 的扩增图谱。

表 1 筛选出的 RAPD 引物序列及扩增结果
Tab.1 Sequence of RAPD primers elected and the amplification results

引物	序列 5'—3'	扩增位点	多态位点数	多态位点比例(%)
S103	AGACGTCCAC	8	5	62.50
S104	GGAAGTCGCC	8	4	50.00
S107	CTGCATCGTG	9	5	55.56
S112	ACGCGCATGT	7	6	85.71
S115	AATGGCGCAG	11	8	72.73
S118	GAATCGGCCA	11	7	63.64
S1104	GAGGGACCTC	9	6	66.67
S1107	AACCGCGGCA	11	9	81.82
S1109	TGCCGGTTCA	10	6	60.00
S1114	TGGTTGCGGA	9	6	66.67
S1116	TGGCGGTTTG	8	3	37.50
总数		101	63	62.38

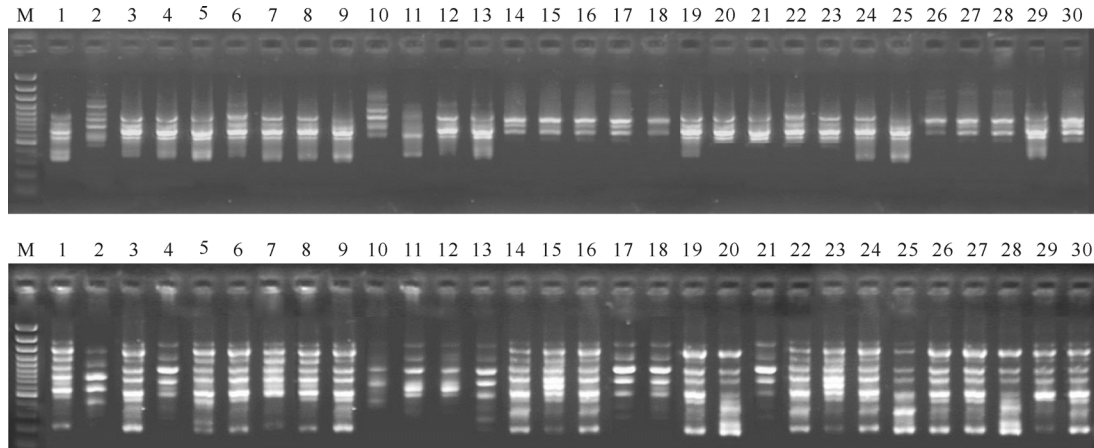


图 1 引物 S112(上)和 S1107(下)的 RAPD 扩增图谱

Fig.1 The amplification patterns of primer S112 and S1107
M 代表分子量标记(GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus), 1—30 代表不同个体

2.2 ISSR 扩增结果分析

77 个 ISSR 引物有 40 个引物都产生扩增条带, 再从中筛选出 10 个扩增位点多、清晰、多态型高的引物用于基因组 DNA 的扩增。扩增结果如表 2。共检测到 88 个位点, 片段大小在 100—3000bp 之间, 其中多态性位点为 61 个, 多态位点比例为 69.32%。每个引物检测出的位点数 5—11 个不等, 平均每个引物为 8.8 个。个体间的遗传距离为 0.1088—0.3847, 平均为 0.1907。图 2 为引物 ISSR74 和 ISSR63 的扩增图谱。

表 2 筛选出的 ISSR 引物序列及扩增结果

Tab.2 Sequence of ISSR primers elected and the amplification results

引物	序列 5'—3'	扩增位点	多态位点数	多态位点比例(%)
ISSR-33	(AG) ₈ AT	10	7	70.00
ISSR-58	(AG) ₈ GA	11	7	63.64
ISSR-59	(AG) ₈ GC	10	6	60.00
ISSR-61	(AG) ₈ GT	8	5	62.50
ISSR-62	(AG) ₈ CA	9	6	66.67
ISSR-63	(AG) ₈ CT	11	10	90.91
ISSR-64	(AG) ₈ CG	8	6	75.00
ISSR-65	(AG) ₈ CC	9	5	55.56
ISSR-74	(ACTG) ₄	5	4	80.00
ISSR-75	(AGTG) ₄	7	5	71.43
总数		88	61	69.32

3 讨论

对于 RAPD 和 ISSR 技术所反映的物种遗传多样

性的定性, 迄今还没有一个明确的定量标准, 也没有系统的研究记录可作比较。本研究结果显示, 丹江口水库野生赤眼鲮群体的 RAPD 和 ISSR 的多态性比例分别为 62.38%和 69.32%, 其平均遗传距离分别为 0.1742 和 0.1907。表 3 结果显示, 与其他鱼类比较, 丹江口水库野生赤眼鲮群体有较高的遗传多样性。虽然由于鱼类的分类地位不同及海洋鱼类与淡水鱼类在基因交流方面的差异, 可能导致它们彼此之间在遗传分化水平上存在差异, 但其多态性比例和平均遗传距离的数值的比较, 在一定程度上仍能反映出某种鱼类遗传多样性的水平。丹江口水库是亚洲第一大人工水库, 水域面积为 750km², 其上游水源流域面积大, 水系发达, 包括汉江和丹江两大水系, 河流数以千计。这些环境特点使丹江口水库野生赤眼鲮的种群大, 个体数量多, 基因交流的机会相对较多, 遗传多样性丰富。推测这一群体蕴藏着比较丰富的育种和遗传改良的潜力, 具有优良亲本的潜能, 因此对其不断进行选育, 将能获得可用于育种的优良赤眼鲮亲本。

本研究中 ISSR 分析获得多态位点比例与平均遗传距离均高于 RAPD 分析。这可能与用于 RAPD 分析的引物较少和样本数量较少有关。如前所述, ISSR 比 RAPD 在扩增多态性与稳定性上更具优点。因此, 它所揭示的群体遗传多样性更加丰富, 反映的遗传结构也更加真实。本研究获得的赤眼鲮的遗传多样性数据作为一种相对的指标, 对今后我国各主要水域中赤眼鲮的遗传变异水平的检测及其种质资源数据库的建立和评价具有参考价值。

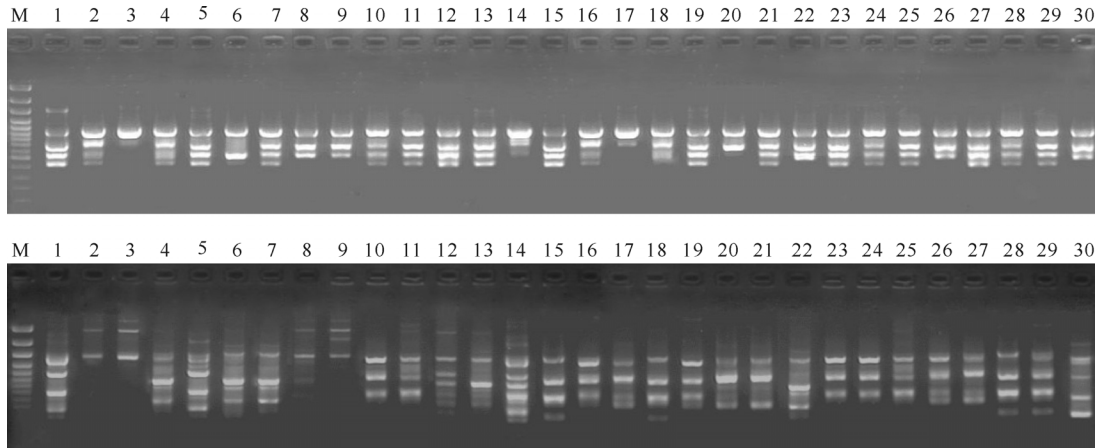


图2 引物 ISSR-74(上)和 ISSR-63(下)的 ISSR 扩增图谱

Fig.2 The amplification patterns of primer ISSR-74 and ISSR-63
M 代表分子量标记(GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus), 1—30 代表不同个体

表3 不同鱼类遗传多样性研究结果比较

Tab.3 Comparison in genetic diversity of different fishes

种类	来源地	多态位点比例(%)		平均遗传距离		文献
		RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	
牙鲆(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	威海近海	59.09	68.94	0.17427	0.19996	房新英等, 2006
小黄鱼(<i>Pseudosciaena polyactis</i>)	黄海南部	—	65.63	—	0.2187	许广平等, 2005
真鲷(<i>Pagrosomus major</i>)	胶州湾	—	—	0.1056	—	江世贵等, 2004
	台湾海峡	—	—	0.1151	—	
	北部湾	—	—	0.1350	—	
刀鲚(<i>Coilia ectenes</i>)	横沙岛	58.25	68.18	0.1309	0.1467	张媛等, 2006
	崇明岛	49.02	57.58	0.1195	0.1296	
	崇明岛	65.74	61.19	0.1454	0.1169	
胭脂鱼(<i>Myxocyprinus asiaticus</i>)	长江宜昌	—	—	0.0726	—	孙玉华等, 2003
	长江金口	—	—	0.0687	—	
丁鲃(<i>Tinca tinca</i>)	新疆朱家湖	24.00	—	0.1033	—	凌去非等, 2006
	新疆 73 水库	22.67	—	0.0965	—	
	捷克	18.42	—	0.0691	—	
黄颡(<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	鄱阳湖	18.4	—	0.0667	—	周秋白等, 2006
长须黄颡(<i>Pelteobagrus eupogon</i>)	鄱阳湖	27.0	—	0.0938	—	周秋白等, 2006
赤眼鲟(<i>Squaliobarbus curriculus</i>)	丹江口水库	62.38	69.32	0.1742	0.1907	本文

参 考 文 献

- 龙光华, 林 岗, 胡大胜等, 2005. 赤眼鲟的繁殖生物学. 动物学杂志, 40(5): 28—36
- 伍献文, 1964. 中国鲤科鱼类志(上卷). 上海: 上海科学技术出版社, 52—53
- 江世贵, 杨慧荣, 苏天凤等, 2004. 3 个不同地理群体真鲷遗传变异的 RAPD 分析. 水产学报, 28(3): 334—338
- 许广平, 仲霞铭, 丁亚平等, 2005. 黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究. 海洋科学, 29(11): 34—38
- 孙际佳, 郭云贵, 李桂峰等, 2006. 赤眼鲟精子入卵的扫描电镜观察. 中国水产科学, 13(5): 740—743
- 孙玉华, 刘思阳, 2003. 中国胭脂鱼种群的遗传分析. 水生生物学报, 27(3): 248—252
- 杨明生, 陈金安, 黄孝湘等, 2006. 府河赤眼鲟的生长和种群结构特征. 水利渔业, 26(6): 59—60, 63
- 张 媛, 胡则辉, 周志刚等, 2006. 利用 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 标记技术分析长江口刀鲚的群体遗传结构. 上

- 海水产大学学报, 15(4): 390—397
- 周秋白, 李风波, 周 莉等, 2006. 黄颡鱼与长须黄颡鱼种间的 RAPD 标记. 水生生物学报, 30(4): 482—485
- 房新英, 张全启, 齐 洁等, 2006. 野生和养殖牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)遗传差异的 RAPD 和 ISSR 研究. 海洋与湖沼, 37(2): 138—142
- 钱 韦, 葛 颂, 2001. 居群遗传结构研究中显性标记数据分析方法初探. 遗传学报, 28(3): 244—255
- 凌去非, 李思发, 乔德亮, 2006. 丁鲃不同群体间形态学差异与随机扩增多态 DNA(RAPD)分析. 水生生物学报, 30(5): 578—586
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著, 金冬雁, 黎孟枫译, 1995. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 304—314
- Fu C Z, Wu J H, Chen J K *et al*, 2003. Freshwater fish biodiversity in the Yangtze River basin of China: patterns, threats and conservation. Biodiversity and Conservation, 12(8): 1649—1685
- Liu Y G, Chen S L, Li J *et al*, 2006. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. Aquaculture, 255: 565—572
- Luis G, Teresa V, Carlos S *et al*, 2001. Comparison between phonetic characterization using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Genetic Resources and Crop Evolution, 48(4): 329—338
- Maltagliati F, Lai T, Casu M *et al*, 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). Biochemical Systematics and Ecology, 34: 625—634
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583—590
- Qian W, Ge S, Hong D Y, 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 102(2): 440—449

GENETIC DIVERSITY IN RAPD AND ISSR ON *SQUALIOBARBUS CURRICULUS* IN DANJIANGKOU RESERVOIR

YANG Tai-You¹, GUAN Jian-Yi^{1,2}, CHEN Hong-Xi¹, WANG Ya-Ping³

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, 453007; 2. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, 453003; 3. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

Abstract Two types of molecular markers, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) were used to detect the genetic diversities among 30 wild individuals of *Squaliobarbus curriculus* collected from Danjiangkou Reservoir, Hubei of China in August 2006. Using 11 RAPD primers screened from 40 primers, a total of 101 reproducible and stable bands, ranging from 100 to 3000bp, were amplified from 30 individuals. 63 of 101 loci detected were polymorphic, of which polymorphic loci took 62.38%. Genetic distance among the individuals was from 0.1049 to 0.3417, averaged at 0.1742. Using 10 ISSR primers selected from 77 primers, 88 reproducible and stable bands were observed, ranging from 100 to 3000bp, and 69.32% of them were polymorphic. The genetic distance among the individuals was from 0.1088 to 0.3847, in average of 0.1907. These results show that the genetic diversification of *S. curriculus* in the reservoir was high.

Key words *Squaliobarbus curriculus*, Genetic diversity, RAPD, ISSR