

# 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究 及其对杂种优势的应用

夏德全 曹 莹 吴婷婷 王 涛

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

**摘 要** 应用 RAPD 技术检测了一个奥利亚罗非鱼养殖群体和湘湖、美国 and 沙市三个尼罗罗非鱼养殖群体。在 20 个引物中筛选到 12 个引物, 它们的扩增产物显示了奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼在群体内或群体间存在遗传差异。OPZ06、POZ10、OPZ12 和 OPZ19 四个引物都有一个扩增片段(大小分别是 900、1500、1700 和 730bp)具有种的特异性, 可以作为鉴别尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的分子遗传标记。群体内遗传相似性指数(S)表明, 湘湖、美国 and 沙市三群体尼罗罗非鱼都保留了较高水平的遗传变异(S 分别为 0.798、0.795 和 0.824), 而奥利亚罗非鱼的群体内遗传变异最小(S=0.950)。显示尼罗罗非鱼具备选育优良品种的遗传潜力, 奥利亚罗非鱼的这种潜力就较小。奥利亚罗非鱼和湘湖、美国、沙市三群体尼罗罗非鱼之间的遗传距离分别是 0.285、0.262 和 0.344 说明奥利亚罗非鱼和沙市群体尼罗罗非鱼杂交将可能产生更强的杂种优势。

**关键词** 随机扩增多态 DNA, 奥利亚罗非鱼, 尼罗罗非鱼, 遗传变异, 杂种优势

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态 DNA)是建立在 PCR 技术基础上的检测 DNA 序列多态性和建立分子遗传标记的技术。因其具有操作简单、能够快速高效地提供许多个体或基因型的许多位点的 DNA 序列多态性数据等优点, 所以它在生物的遗传多样性、群体遗传学、分类学以及农牧业的遗传育种研究中得到广泛的应用[王京兆等 1995, 孙其信等 1996, 李文彬等 1995, Bardakci 和 Skibinski 1994, Lu 和 Rank 1996, Melchinger 等 1990]。本研究以奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurus*)和尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)为材料, 用 RAPD 方法研究两种鱼及其不同群体的遗传多样性, 并探讨它在预测杂种优势中的应用。

尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼都是我国的主要淡水养殖鱼类。研究其遗传多样性对保护罗非鱼种质资源、保证罗非鱼养殖业的健康发展具有重要的意义。同时, 罗非鱼养殖业的发展方向是选育新的优良品种, 但它必须建立在丰富的遗传多样性的基础上。尤其是利用杂种优势选育具有优良经济性状的杂交种。农作物杂种优势利用的实践表明, 杂种优势的遗传基础是杂交种基因型的杂合性, 而要增加杂交种基因型的杂合性, 杂交亲本之间要具有较大的遗传差异[孙其信等 1996]。因此, 根据杂种优势的普遍性, 研究不同于罗非鱼及其不同群体的遗传差异, 可以为选配杂种优势强的亲本提供遗传学依据。

# 1 材料和方法

## 1.1 实验材料

研究所用的奥利亚罗非鱼和三个尼罗罗非鱼群体均取材于本所试验场,其来源列于表 1。从每一群体中各取 4 尾用于分析。

表 1 研究所用的罗非鱼及其来源

Tab. 1 *O. niloticus* and *O. aureus* used in the study and their sources

| 群 体       | 来 源                               | 代 码 |
|-----------|-----------------------------------|-----|
| 奥利亚罗非鱼    | 淡水渔业研究中心于 1983 年从美国引进,原产于以色列      | au  |
| 尼罗罗非鱼湘湖群体 | 湖南省长沙湘湖渔场 1990 年从埃及阿斯旺坝下游的伊斯曼利亚引进 | nx  |
| 尼罗罗非鱼美国群体 | 淡水渔业研究中心 1992 年从美国引进,原产尼罗河下游      | nm  |
| 尼罗罗非鱼沙市群体 | 1978 年长江水产研究所从苏丹境内尼罗河的阿旺坝上游引进     | ns  |

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 试剂和仪器

研究所用随机引物试剂盒(Kit Z)为美国 Operon 公司产品,各引物序列见表 2;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等是华美生物工程公司产品。PCR 仪系美国 PE 公司的 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480。

### 1.2.2 罗非鱼核 DNA 的制备

从每尾罗非鱼的尾静脉中取血液制备核 DNA,在血中加入 1/6 体积的酸性柠檬酸葡萄糖溶液 B(ACD)作抗凝剂。

将 30 $\mu$ L 全血加入 470 $\mu$ L SET 缓冲液(150mM NaCl, 50mM Tris $\cdot$ HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)中,混匀后依次加入 SDS 和蛋白酶 K

分别至终浓度 0.5%和 100 $\mu$ g/mL。轻轻混匀后置于 55 $^{\circ}$ C 水浴中过夜,而后将混合物用等体积的酚/酚/氯仿/异戊醇(25/21/1)以及氯仿/异戊醇(24/1)各抽提一次。弃有机相,向水相中加入两倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA。将所有沉淀清洗、干燥,溶于 150 $\mu$ L TE(pH7.4)缓冲液中。用紫外分光光度计测量 DNA 样品的浓度和纯度,再稀释至 10ng/ $\mu$ L。置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.2.3 RAPD 反应

扩增反应在 25 $\mu$ L 体积中进行,其中含有 50mM KCl, 10mM Tris $\cdot$ HCl, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%Triton X-100, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2mM, 15ng 引物, 20ng 核 DNA, 1.2 单位 Taq DNA 聚合酶。反应液覆以 25 $\mu$ L 液体石蜡油。反应条件是:将加入模板的反应混合物在 94 $^{\circ}$ C 下预变性 4min, 然后加入 Taq 酶,进行循环扩增。循环程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 经过 45 个循环之后,再在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10min。扩增产物在含 0.5 $\mu$ g/mL EB 的 1.4%琼脂糖凝胶中电泳。在紫外灯下观察并照相记录结果。

表 2 研究所用的随机引物及其序列

Tab. 2 Random primers used in the study and their sequences

| 引物    | 序列(5' $\rightarrow$ 3') | 引物    | 序列(5' $\rightarrow$ 3') |
|-------|-------------------------|-------|-------------------------|
| OPZ01 | TCTGTGCCAC              | OPZ11 | CTCAGTCGCA              |
| OPZ02 | CCTACGGGGA              | OPZ12 | TCAACGGGAC              |
| OPZ03 | CAGCACCGCA              | OPZ13 | GACTAAGCCC              |
| OPZ04 | AGGCTGTGCT              | OPZ14 | TCCGAGGTTC              |
| OPZ05 | TCCCATGCTG              | OPZ15 | CAGGGCTTTC              |
| OPZ06 | GTGCCGTTCA              | OPZ16 | TCCCCATCAC              |
| OPZ07 | CCAGGAGGAC              | OPZ17 | CCTTCCCACT              |
| OPZ08 | GGGTGGGTAA              | OPZ18 | AGGGTCTGTG              |
| OPZ09 | CACCCAGTC               | OPZ19 | GTGCGAGCAA              |
| OPZ10 | CCGACAAACC              | OPZ20 | ACTTTGCGCG              |

### 1.3 分析方法

根据 RAPD 产物的电泳带型, 进行群体内和群体间的比较分析。在相同的迁移率上, 出现的带记为 1, 未出现的带记为 0, 按公式  $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$  计算个体间遗传相似性指数, 式中  $n_{xy}$  是个体 x 和 y 的共有带数,  $n_x$  和  $n_y$  分别是个体 x 和 y 的扩增带数 [Lynch 1990]。

群体内的相似性指数(S)是群体内所有的两个体间相似指数的平均值。群体间的遗传相似性指数( $S_{ij}$ )为群体 i 中的个体和群体 j 中的个体随机组合所得相似指数平均值。用公式  $D_{ij} = -\ln(S_{ij} / \sqrt{S_i S_j})$  可将群体间的相似指数转换成群体间的遗传距离 [Lynch 1991]。统计时仅记录清晰稳定的扩增带。

## 2 结果

在所用的 20 个引物(表 2)中, 共筛选到 12 个引物: OPZ03、OPZ06、OPZ07、OPZ08、OPZ09、OPZ10、OPZ12、OPZ14、OPZ16、OPZ19 和 OPZ20, 它们都产生了具有群体或个体特异性的带型, 呈现出多态现象(图 1A、B、C、D)。12 个引物共产生 108 条扩增带, 平均每个引物产生 9 条带; 其中 24 条带(22%)为四个罗非鱼群体所共有, 84 条带(78%)具有群体或个体特异性。图 1 表明, 有 4 个扩增片段可以作为鉴别尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的遗传标记: 在 OPZ06 的产物中, 奥利亚罗非鱼有一条 900bp 的片断, 在尼罗罗非鱼中未出现(图 1A); 在 OPZ10 的产物中, 尼罗罗非鱼有一条 1500bp 的片段, 在奥利亚罗非鱼中未出现(图 1B); 在 OPZ12 的产物中, 尼罗罗非鱼有一条 1700bp 的片段, 而在奥利亚罗非鱼中没有此片段(图 1C); 在 OPZ019 的产物中, 尼罗罗非鱼有一条 730bp 的片段, 在奥利亚罗非鱼中也未出现此片段(图 1D)。这些扩增的片段都具有种的特异性, 可以作为鉴别这两种鱼的遗传标记。

依据这 12 个引物的扩增结果, 计算出奥利亚罗非鱼群体和三个尼罗罗非鱼群体和群体内和群体间相似性指数和遗传距离(表 3)。

表 3 显示, 奥利亚罗非鱼群体和湘湖、美国、沙市三个尼罗罗非鱼群体的群体内遗传相似性指数分别是 0.950、0.798、0.795、0.824。湘湖和美国两个尼罗罗非鱼群体的群体内相似性指数都较小, 因而说明此两群体的群体内遗传变异程度较大; 沙市尼罗罗非鱼的群体内遗传相似性指数稍大, 说明其群体内遗传变异性相对小一些; 群体内遗传相似性指数最大的群体是奥利亚罗非鱼( $S=0.950$ ), 可以推断奥利亚罗非鱼的遗传变异甚小。在三个尼罗罗非鱼的群体间, 美国群体和沙市群体间的相似性最大( $S=0.761$ ), 遗传距离最小( $D=0.062$ ); 湘湖群体和美国群体的相似性次之( $S=0.741$ ), 遗传距离稍大( $D=0.072$ ); 湘湖群体和沙市群体的遗传相似性最小( $S=0.710$ ), 其间的遗传距离也相应地最大( $D=0.133$ )。奥利亚罗非鱼和湘湖、美国、沙市三个尼罗罗非鱼群体之间的遗传距离分别是 0.285、0.262、0.344。Bardakci 和 Skibinski [1994] 对奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的种内、种间遗传差异的进行了研究, 其数据与本研究结果十分吻合。

表 3 奥利亚和尼罗罗非鱼四个群体内和群体间的遗传相似性指数以及群体间遗传距离

Tab. 3 Inter- and intrapopulation genetic similarity indices and interpopulation genetic distances

| 群体 | au    | nx    | nm    | ns    |
|----|-------|-------|-------|-------|
| au | 0.950 | 0.655 | 0.699 | 0.627 |
| nx | 0.285 | 0.798 | 0.741 | 0.710 |
| nm | 0.262 | 0.072 | 0.795 | 0.761 |
| ns | 0.344 | 0.133 | 0.062 | 0.824 |

注: 数字矩阵对角线上的数字表示群体内的相似指数; 对角线以上的数字表示群体间的相似性指数; 对角线以下的数这表示遗传距离。

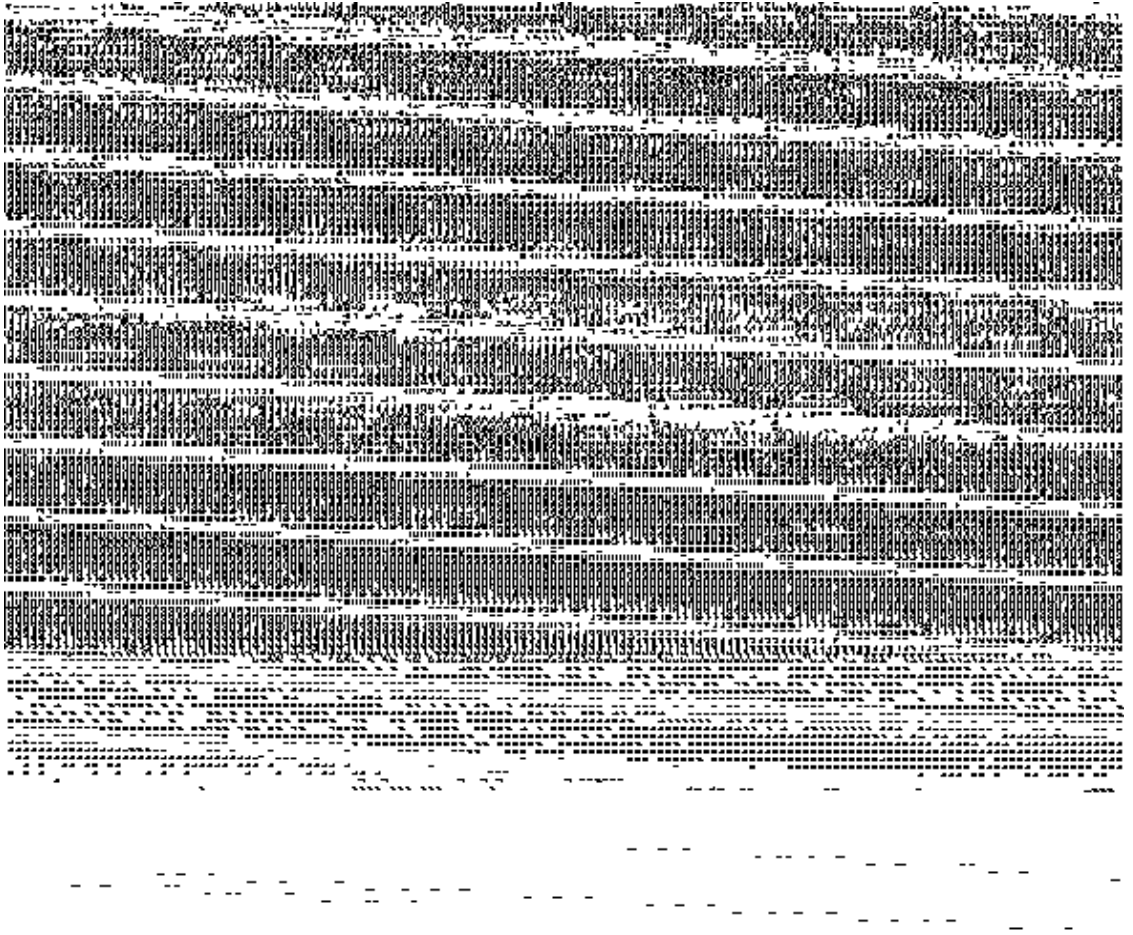


图1 引物 OPZ06(A)、OPZ10(B)、OPZ12(C)和 OPZ19(D)的扩增电泳图谱(白色箭号示特异带)

Fig. 1 RAPD patterns from each of one population of *O. aurus* and three populations of *O. niloticus* using primers OPZ06(A), OPZ10(B), OPZ12(C) and OPZ19(D) (Arrows show species-specific bands)

M:  $\lambda$ DNA/EcoRI + HindIII a-d: 奥利亚罗非鱼(nx), e-h: 湘湖尼罗罗非鱼(nx), i-l: 美国尼罗罗非鱼(nm), m-p: 沙市尼罗罗非鱼(ns).

### 3 讨论

用以研究鱼类遗传多样性和遗传标记的方法有多种, 都能在一定程度上提供鱼类群体遗传变异的信息和鉴别标记。本研究利用 RAPD 分析法, 很好地检测出不同罗非鱼群体内或群体间的遗传差异并建立鉴别两种罗非鱼的分子遗传标记。本研究从 20 个引物中筛选到 12 个引物, 它们均在四个罗非鱼群体间或群体内检测到了核基因组的差异, 但每个引物检测出的差异程度有所不同。12 个引物的 108 条扩增带中, 有 84 (78%) 条带具有多态性, 这表明 RAPD 是一种高效的检测 DNA 多态性的方法。同时, 有 4 个片段具有种的特异性, 都可以作为鉴别

奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的分子遗传标记。在三个尼罗罗非鱼群体间, 由于它们的亲缘关系特别接近( $D=0.062\sim0.133$ ), 因而用筛选到的 12 个引物没有找出鉴别三个群体尼罗罗非鱼的分子遗传标记。

在三个尼罗罗非鱼群体中, 群体内的遗传相似性指数在  $0.795\sim0.824$  之间, 显示所研究的尼罗罗非鱼群体虽然都经历了引进过程遗传瓶颈效应的影响, 但都保留了较高水平的遗传变异。相形之下, 奥利亚罗非鱼群体内的遗传相似性指数高达  $0.950$ , 说明奥利亚罗非鱼的遗传变异程度甚小。从奥利亚罗非鱼的引进过程可以对此现象作出合理的解释: 美国最先从以色列引进奥利亚罗非鱼, 其时仅存活一雌三雄, 这就意味着大量遗传变异的失去; 1983 年分析从美国引进时经历第二次瓶颈效应, 使得奥利亚罗非鱼的遗传变异再一次丢失。群体内遗传相似性指数表明, 如若进行罗非鱼优良品种的选育, 由于尼罗罗非鱼的遗传变异性较大, 尚具备进行这类工作的遗传潜力, 而奥利亚罗非鱼可能就困难一些。

根据四个罗非鱼群体的计算结果, 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼种间的遗传距离在  $0.262\sim0.344$  之间, 说明两种鱼的亲缘关系很接近, 其中奥利亚罗非鱼和尼罗非鱼的沙市群体之间遗传距离最大( $D=0.344$ ); 尼罗罗非鱼三群体间遗传距离在  $0.062\sim0.133$  之间, 其中沙市群体和湘湖群体间距离最大( $D=0.133$ )。实践已经证明, 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的杂交后代呈现明显的杂种优势。若亲本属于具有遗传差异的不同群体, 那么杂交后代呈现的杂种优势的强弱不同。据 Melchinger 等[1990] 以及孙其信等[1996] 报道, 在遗传距离小于  $0.54$  的范围内, 亲本间的遗传距离越大, 那么杂交子代基因型的杂合度越高, 因而杂种优势越强。以此推断, 用奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的沙市群体作为亲本, 杂交后代将会呈现更强的杂种优势。另外, 若利用不同群体的尼罗罗非鱼进行种内杂交选育, 由于沙市群体和湘湖群体间的遗传距离最远, 这两个尼罗罗非鱼群体应是更理想的亲本。

## 参 考 文 献

- 王京兆, 王 斌, 徐琼芳等. 1995. 用 RAPD 方法分析水稻光敏核不育基因. 遗传学报, 22(1): 53~58
- 孙其信, 黄铁城, 倪中福. 1996. 小麦杂种优势群体研究: I 利用 RAPD 标记研究小麦品种间遗传差异. 农业生物技术学报, 4(2): 103~109
- 李文彬, 周小梅, 张 健等. 1995. 水稻三系及其杂种的 RAPD 指纹图谱分析. 农业生物技术学报, 3(2): 1~6
- Bardacki F, Skibinski D O F. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity, 73: 117~123
- Lu R, Rank G H. 1996. Use of RAPD analysis to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf-cutting bee *Megachile rotundata*. Genome, 39: 655~663
- Lynch M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol, 7: 478~484
- Lynch M. 1991. DNA fingerprinting approaches and applications. Switzerland: Basel. 113~126
- Melchinger A E, Lee M, Lamkey K R. 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. Theor Appl Genet, 80: 488~496

## A STUDY ON GENETIC VARIATION OF TILAPIAS FISH WITH RAPD ANALYSIS AND ITS APPLICATION TO HETEROSIS

XIA De-Quan, CAO Ying, WU Ting-Ting, WANG Tao  
(Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081)

**ABSTRACT** Three cultured populations (Xianghu, American and Shashi) of *Oreochromis niloticus* and one cultured population of *O. aureus* were examined using RAPD method. 12 primers were screened out of 20 random primers, and each of the 12 primers revealed inter-or/ and intrapopulation genetic variation. There were four species-specific amplification bands (sizing 900, 1500, 1700 and 730 bp respectively) of primers OPZ06, OPZ10, OPZ12 and OPZ19, each of which could be used as molecular genetic markers to identify *O. niloticus* and *O. aureus*. Genetic similarity indices (S) suggested that the three populations of *O. niloticus* maintained the higher degrees of the intrapopulation genetic variation (S for the three populations of Xianghu, American and Shashi were 0.798, 0.795 and 0.824 respectively), and *O. aureus* had the smallest degree of genetic variation (S=0.950) because of two times of genetic bottleneck effect. The data suggest that there is the genetic potential of developing new *O. niloticus* varieties, while there is relatively small genetic potential in *O. aureus*. Inter-specific genetic distances between *O. aureus* and three populations of *O. niloticus* were 0.285, 0.262 and 0.344, respectively, which suggest that the offspring of *O. aureus* and Shashi population of *O. niloticus* will develop stronger heterosis than that of other two cross combinations.

**KEYWORDS** RAPD, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis niloticus*, Genetic variation, Heterosis