

文章编号:1000 - 0615(2002)05 - 0472 - 05

研究简报 ·

彭泽鲫的分子遗传分析及其与 方正银鲫 A 系的比较

李名友, 周 莉, 杨 林, 刘静霞, 桂建芳

(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, 湖北 武汉 430072)

关键词: 彭泽鲫; 雌核发育银鲫; 同工酶; 转铁蛋白; 随机扩增多态性 DNA

中图分类号: Q342; S917 文献标识码: A

Molecular genetic analysis on Pengze crucian carp and comparison with strain A of gynogenetic silver crucian carp

LI Ming-you, ZHOU Li, YANG Lin, LIU Jing-xia, GUI Jian-fang

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Genetic homogeneity between Pengze crucian carp and strain A of silver crucian carp was studied by using transferrin, isozyme and RAPD markers. The studied individuals of Pengze crucian carp showed transferring patterns were the same of silver crucian carp A strain while distinct from those of other crucian carp populations. As far as isozyme is concerned, the MDH, LDH and EST are all of the same with only slight differences in SOD between them. The RPAD patterns clearly indicated high homogeneity among 16 individuals (6 sampled from individuals of two years old and the others aged one) from crucian carp of Pengze and 5 individuals from strain A of silver crucian carp. Nearly identical banding patterns were observed among all individuals. Average genetic distance within all the individuals is only 0.011, suggesting crucian carp of Pengze might possess identical genetic background with strain A of silver crucian carp.

Key words: *Carassius auratus* var. pengsenensis; gynogenetic silver crucian carp; isozyme; transferrin; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

彭泽鲫是从江西省彭泽县丁家湖、芳湖和太白湖等自然水域经长期人工选育而成的一个鲫鱼养殖品系。由于其具有生长快、适应性强、肉味鲜美等优点,目前已在全国普遍养殖,深受欢迎。早在 20 世纪 80 年代,彭泽鲫被认为是具有 100 条染色体的两性二倍体鲫鱼。然而,经过长期人工选育和养殖后,发现彭泽鲫是营雌核发育的三倍体种群,类似起源于黑龙江省方正县双风水库的天然雌核发育银鲫^[1,2]。我们在运用 RAPD 技术进行雌核发育银鲫遗传多样性的研究中,发现彭泽鲫与银鲫的其中一个品系 A 系^[3]具有高度的遗传同质性^[4]。为了进一步明确彭泽鲫的遗传特征及其生殖方式,我们在全国水产技术推广总站的组织下,从江西省九江市彭泽鲫良种场随机抽取两代彭泽鲫的一批样本,应用转铁

收稿日期:2002-02-22

资助项目:中国科学院创新方向性项目(KSCX2-1-05)和国家科技攻关计划专题(2001BA505B0509)

作者简介:李名友(1977-),男,湖北石首人,硕士研究生,主要从事鱼类遗传育种研究。

通讯作者:桂建芳(1956-),男,湖北黄梅人,研究员,主要从事细胞遗传学与发育生物学研究。E-mail:jfgui@ihb.ac.cn

蛋白、同工酶和 RAPD 标记技术,研究分析了彭泽鲫的分子遗传特性,并与源于黑龙江方正县双风水库的方正银鲫 A 系进行了比较。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所需彭泽鲫是从江西省九江市彭泽鲫良种场 2 个不同世代的繁育群体中随机取样,一组为 1 龄鱼,将其标记为 P1;另一组为 2 龄鱼,将其标记为 P2。A 系银鲫取自中国科学院水生生物研究所关桥鱼类遗传育种基地,为 2 龄鱼。

1.2 转铁蛋白的制备和电泳

采用尾静脉取血法,从 8 尾 2 龄的彭泽鲫和 1 尾 2 龄的 A 系银鲫取血。分离血清和红细胞。取 20 μ L 血清用于转铁蛋白(Tf)的制备,转铁蛋白的初步纯化、电泳分离和显色均参照文献[5]的方法进行。

1.3 红细胞同工酶的分离和显色

从 1.2 中分离的红细胞用 1%NaCl 溶液清洗 3 次,再加入等体积的双蒸水和 0.5mL 甲苯,激烈震荡 5min 以使红细胞破裂,然后在高速离心机上以 10 000r \cdot min⁻¹离心 20min,中间层即是红细胞解离液;红细胞中的 4 种同工酶的分离和显色均参照文献[5]所述方法进行。

1.4 基因组总 DNA 的提取和 RAPD 反应

取 16 尾彭泽鲫(其中 6 尾 2 龄鱼和 10 尾 1 龄鱼)和 5 尾 2 龄 A 系银鲫的尾鳍提取基因组总 DNA。基因组总 DNA 的提取参照标准酚-氯仿抽提程序进行^[6]。RAPD 反应程序参照 Zhou 等^[4,7-9]描述的方法进行。随机引物为 Operon 公司的 Opj 组。

1.5 RAPD 数据分析

在所扩增的 15 个引物中,12 个引物扩增出了可重复的清晰的 DNA 带纹。这 12 个引物在 21 尾个体中共有 1617 条可分辨的 DNA 带(平均每个个体 77 条),用 1 或 0 分别表示 DNA 带的有或无。21 尾个体间的遗传距离通过 Apostol^[10]的公式并运用 RAPDinstance (11.04) 软件计算。

2 结果

2.1 转铁蛋白 Tf 的表型分析

前期的研究表明,转铁蛋白在雌核发育银鲫的不同品系(克隆)中表现出丰富的遗传异质性,而在同一雌核发育品系的不同个体间则高度均一^[5]。本研究所分析的 8 尾彭泽鲫个体表现出一一致的转铁蛋白图谱,并与 A 系银鲫的转铁蛋白谱带完全相同(具等位基因 Tf^a 与 Tf^c) (图版 - 1),而与其它银鲫品系明显不同^[5]。

2.2 红细胞同工酶电泳

在本研究中,我们共分析了红细胞的 4 种同工酶,分别为乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、酯酶(EST)和超氧化歧化酶(SOD)。8 尾彭泽鲫个体和 1 尾 A 系银鲫的 LDH 和 MDH 谱型是一致的。其中 LDH 清晰可辨的蛋白带有 10 余条(图版 - 2)。苹果酸脱氢酶在鱼类组织中以细胞质型(s - MDH)和线粒体型(m - MDH)2 种形式存在,红细胞中只有 s 型表达^[11]。由 2 个基因编码的二聚体酶 s - MDH,电泳一般可分出 3 条表达很强的带(图版 - 3)。在酯酶的 5 个座位中,8 尾彭泽鲫个体和 1 尾 A 系银鲫都是一致的(图版 - 4);彭泽鲫和 A 系银鲫的 SOD 同工酶都由快速区、中速区和慢速区组成。在慢速区和中速区的谱带在所分析的 9 尾个体中是一致的,而在快速区银鲫具有一条特异的带(图版 - 5)。

2.3 RAPD 分析

前期的研究表明^[4],雌核发育银鲫品系内具有高度的遗传同质性,而且 A 系银鲫与彭泽鲫的平均遗传距离仅为 0.001,因此本研究随机抽取 5 尾 A 系银鲫和 16 尾彭泽鲫采用 15 个随机引物进行扩增。

在所扩增的 15 个引物中,其中 12 个引物扩增出重复清晰可辨的 DNA 片段,2 个引物扩增出模糊的带纹,1 个引物未能扩增出任何产物。RAPD 扩增图谱清晰地显示出,所分析的来自两个不同世代的繁育群体的 16 尾彭泽鲫与 5 尾 A 系银鲫个体间具有高度的遗传同质性,所有个体呈现出几乎一致的图谱(图版 - 6),偶尔可检测到细微的多态性,个体间的平均遗传距离仅为 0.011。其中 A 系银鲫与 2 龄彭泽鲫个体之间的平均遗传距离为 0.007,与 1 龄彭泽鲫个体之间的平均遗传距离为 0.014,A 系银鲫个体间的平均遗传距离为 0.01,所有 21 个个体之间的平均遗传距离为 0.011(表 1)。因此,我们推测彭泽鲫应该是与 A 系银鲫遗传背景基本相似的一个品系。

3 讨论

转铁蛋白在铁离子运输、细胞增殖和分化、抗感染以及免疫系统的调控中起了重要的作用,在鱼类中具有丰富的多态性,可以作为品系鉴定和分子标记辅助育种的可靠生化遗传指标^[12-14]。同工酶电泳在过去 30 多年来,一直被鱼类遗传学家广泛用作分析种群遗传特征的主要工具^[12-14]。RAPD 技术是一种简单、快捷和灵敏的方法,在种内,尤其在高度近交品系的遗传多态性分析方面获得了广泛应用^[15]。在前期工作中,我们分别运用转铁蛋白、同工酶标记技术和 RAPD 技术研究了雌核发育银鲫的遗传多样性,结果表明,转铁蛋白、同工酶和 RAPD 技术在区分不同的雌核发育银鲫品系,研究品系间的相互关系等方面非常有效^[4,5]。因此,在本研究中,我们仍然运用转铁蛋白、同工酶和 RAPD 标记技术,研究了彭泽鲫的分子遗传特性,并与源于黑龙江的方正银鲫 A 系进行了比较。

至今,彭泽鲫经过江西省九江市水产科学研究所 10 年 9 代精心选育,性状优良,具有明显的养殖优势。彭泽鲫苗种的培育是通过其种群内的雌雄个体近亲交配实现的,因此目前彭泽鲫的种群高度纯合。与此结论一致的是,在我们所分析的随机抽取的彭泽鲫两个不同世代的繁育群体中,其中 6 尾 2 龄个体间的平均遗传距离仅为 0.004 3,10 尾 1 龄个体的平均遗传距离为 0.01。

早在 20 世纪 80 年代,朱蓝菲和蒋一^[12]利用血清蛋白和组织相容性监测,从银鲫的天然种群中区分出 4 个生物学特性不同的雌核发育品系(A、B、C、D)^[12]。最近, Yang 等研究结果表明,转铁蛋白和同工酶在鲫的不同种群中表现出丰富的遗传异质性,而在同一雌核发育品系的不同个体间则高度均一,并将转铁蛋白和同工酶作为一生化标记用于区分银鲫的不同品系^[5]。本研究所分析的彭泽鲫种群与 A 系银鲫具有相同的转铁蛋白图谱;同工酶中的 MDH、LDH 和 EST 也是一致的,仅 SOD 在 A 系银鲫有其特有的一条带。张辉等比较分析了银鲫和彭泽鲫的 mtDNA 限制性长度多态性,研究表明银鲫和彭泽鲫的平均遗传距离仅为 0.017^[2]。Zhou 等的研究表明,银鲫同一雌核发育品系内的个体具有高度的遗传同质性,而不同品系间的个体具有高度的遗传异质性,譬如品系 D 和 E 间的平均遗传距离高达 0.364,但品系 A 和彭泽鲫的平均遗传距离仅为 0.005^[4]。本研究的结果与此一致,所分析的 16 尾彭泽鲫和 5 尾 A 系银鲫个体间的平均遗传距离仅为 0.011。杨兴棋等^[1]和张辉等^[2]均将彭泽鲫鉴定为营雌核发育生殖的三倍体。结合上述研究结果,我们推测彭泽鲫应该是与 A 系银鲫具有基本相似遗传背景的一个品系。自 20 世纪 80 年代后银鲫在全国范围内推广养殖,彭泽鲫可能是从养殖银鲫的池塘中逃逸出来而进入天然水域的外来鱼,并由于其比野生两性种群具有明显的生长优势而被鱼类育种者选育出来^[4,14]。而同工酶之所以存在微弱的差别,我们推测可能是由于 10 多年的隔离养殖和不同的育苗方式造成的。在方正银鲫 10 多年的选育和苗种培育过程中,尽管一直采用异精雌核发育的方式培育苗种,但在未阐明银鲫生殖方式多样性的前提下,可能使种群内不同品系间的雌雄个体发生交配导致了遗传物质的重组。因此,现培育的 A 系银鲫可能与最初天然种群中鉴定的 A 系银鲫存在着差异,而彭泽鲫的遗传背景可能与最初天然种群中鉴定的 A 系银鲫更为相似。

最近 Zhou 等^[7-8]在鉴定出特异于银鲫不同品系 RAPD 分子标记的基础上,设计不同品系间的人工繁育实验,并利用已鉴定的 RAPD 分子标记,比较分析人工繁育组合子代 DNA 的扩增情况,为营雌核发育的银鲫具有两性生殖方式提供了确凿的分子生物学证据。即银鲫的卵子当用异源精子与其受精时,采用的是典型雌核发育生殖方式,产生与其母本性状一致的全雌性后代;而当用其种群内雄性个体产生的精子与其受精时,采用两性生殖方式,产生遗传性状分化的两性后代。银鲫两种生殖方式的揭示对银鲫的养殖实践和苗种培育也具有很重要的指导意义。在实际的养殖实践中,我们发现两性生殖子代性状发生分化,雄性或不育的个体普遍生长缓慢,从而大大影响每公顷的平均产量,导致产量的降

表 1 彭泽鲫两个不同世代繁育群体和 A 系银鲫个体间的平均遗传距离

Tab. 1 The average genetic distances among individuals from two generations of crucian carp of Pengze and strain A of silver crucian carp

	A	P1	P2
A	0.010 ±0.013		
P1	0.014 ±0.015	0.015 ±0.011	
P2	0.0073 ±0.012	0.010 ±0.011	0.0043 ±0.0063

注:A 为 A 系银鲫,P1 为 1 龄彭泽鲫,P2 为 2 龄彭泽鲫

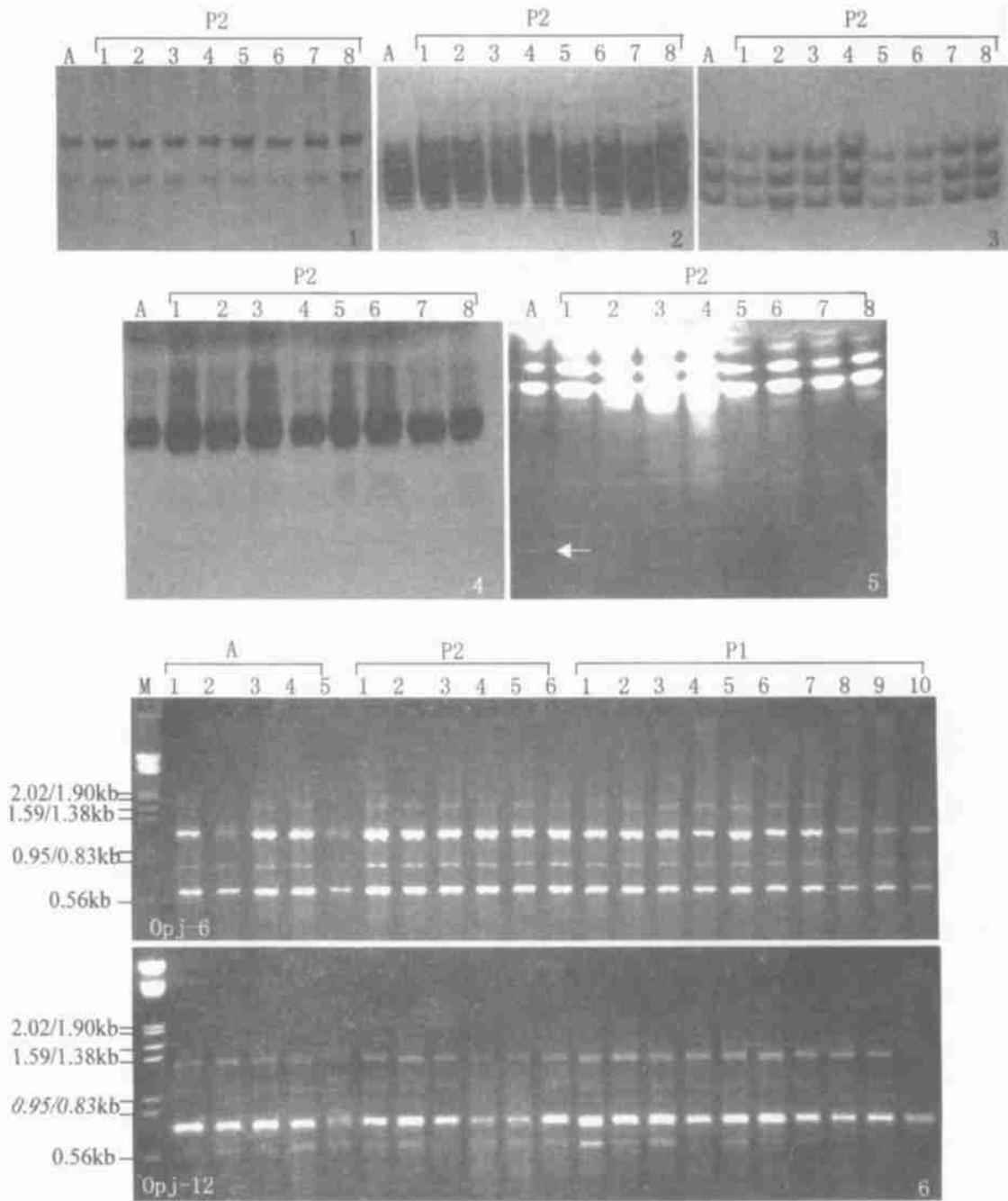
Notes: A means strain A of gynogenetic silver crucian carp, P1 means Pengze crucian carp aged one, P2 means Pengze crucian carp aged two

低。与银鲫两性生殖后代的情况类似,彭泽鲫种群内的雄性个体约占 16.7%~20%,而且雄性个体个头偏小。在所分析的 6 尾 2 龄个体中,选取了 4 尾雌性个体,2 尾雄性个体。尽管在所扩增的 12 个引物中,雌雄个体间没有检测到差异,但雌雄个体间存在生长差异。在我们从江西省九江市彭泽鲫良种场随机抽样的 11 尾 2 龄鱼中,其中最小的 1 尾个体为雄性,仅有 267g,另外还有 3 尾雄性个体,体重均在 305g 左右。而其余的 7 尾雌性个体最大 1 尾个体体重达 357g,最小的 1 尾也有 318g。

银鲫两种生殖方式的揭示提示我们在优良品种的育苗中,应该采取异精刺激雌核生殖的方式,才能保证优良性状的稳定遗传。而银鲫的两性生殖方式必须在鱼类遗传育种工作者的严格控制下合理利用,才能有望从中获得具有优良性状的重组个体,并通过异精刺激雌核生殖的方式将优良性状稳定的遗传下去,建立新的养殖品系。如果不合理的利用银鲫的两性生殖方式,则会导致品种混杂和退化。鉴于彭泽鲫被鉴定为与 A 系银鲫具有基本相似的遗传背景的一个品系,考虑到银鲫生殖方式的特殊性,建议在进行彭泽鲫育苗时应采用和异育银鲫相同的方法。

参考文献:

- [1] Yang X Q, Chen M R, Yu X M, et al. Preliminary studies on the mode of reproduction in crucian carp (*Carassius auratus* of Pengze) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1992, 16: 277 - 280. [杨兴棋,陈敏容,俞小牧,等. 江西彭泽鲫生殖方式的初步研究[J]. 水生生物学报, 1992, 16: 277 - 280.]
- [2] Zhang H, Dong X H, Ye Y Z, et al. Comparative studies of the mtDNA from three strain of triploid *Carassius auratus* and *C. auratus auratus* [J]. Acta Genetica Sinica, 1998, 25(4): 330 - 336. [张辉,董新红,叶玉珍,等. 三个三倍体鲫鱼品系及野鲫 mtDNA 的比较研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(4): 330 - 336.]
- [3] Zhu L F, Jiang Y G. Intraspecific of different genetic markers of the gynogenetic silver crucian carp and their application to selective breeding [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1987, 11(2): 105 - 111. [朱蓝菲,蒋一珪. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用[J]. 水生生物学报, 1987, 11(2): 105 - 111.]
- [4] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of gynogenetic silver crucian carp markers [J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 88: 133 - 139.
- [5] Yang L, Yang S T, Wei X H, et al. Genetic diversity among different clones of the gynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio*, revealed by transferrin and isozyme markers [J]. Biochemical Genetics, 2001, 39: 213 - 225.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 463 - 468.
- [7] Zhou L, Fang L C, Gui J F. RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic in multiple species of silver crucian carp [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22(4): 301 - 306. [周莉,樊连春,桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整合的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 1998, 22(4): 301 - 306.]
- [8] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays [J]. Journal of Molecular Evolution, 2000, 51: 498 - 506.
- [9] Zhou L, Gui J F. Studies on genetic diversity in gonochoristic offspring production from mating between two different gynogenetic clones of silver crucian carp [J]. Acta Biologica Experimentalis Sinica, 2001, 34(3): 169 - 176. [周莉,桂建芳. 银鲫两个雌核发育克隆间两性生殖后代的遗传多样性分析[J]. 实验生物学报, 2001, 34(3): 169 - 176.]
- [10] Apostol B L. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 991 - 1000.
- [11] Coppes Z L, Venchi S, Ferreira E, et al. Multilocus isozyme systems in fishes [J]. Comp Biochem Physiol, 1990, 96: 1.
- [12] Zhu L F, Jiang Y G. A comparative studies of the biological characters of the gynogenetic clones of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(2): 112 - 120. [朱蓝菲,蒋一珪. 银鲫不同雌核发育系的生物学特征比较研究[J]. 水生生物学报, 1993, 17(2): 112 - 120.]
- [13] Payne R H. Transferrin variation in north American population of Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. J Fish Res Board Can, 1974, 31: 1037 - 1041.
- [14] Wu Q J, Gui J F. Fish Genetics and Breeding Engineering [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1999. 150 - 152. [吴清江,桂建芳. 鱼类遗传育种工程 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 150 - 152.]
- [15] Caccone A, Allegrucci G, Fortunato C, et al. Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays [J]. J Hered, 1997, 2: 327 - 330.



图版说明

Explanation of Plate

1. A 系银鲫和彭泽鲫 (P2) 的转铁蛋白电泳图谱; 2. A 系银鲫和彭泽鲫 (P2) 的酯酶电泳图谱 (4% ~ 30% PAGE); 3. A 系银鲫和彭泽鲫 (P2) 的超氧化歧化酶电泳图谱 (4% ~ 30% PAGE), 箭头所示为 A 系银鲫特有的蛋白带; 4. A 系银鲫和彭泽鲫 (P2) 的乳酸脱氢酶电泳图谱 (4% ~ 15% PAGE); 5. A 系银鲫和彭泽鲫的苹果酸脱氢酶电泳图谱 (4% ~ 15% PAGE); 6. 引物 Opj - 6 和 Opj - 12 扩增的 2 组典型的 RAPD 产物的扩增图谱电泳图

1. Electrophoretic pattern of transferrins shown by strain A of gynogenetic silver crucian carp and Pengze crucian carp (P2); 2. EST electrophoretic patterns on 4% - 30%; 3. SOD electrophoretic patterns on 4% - 30% PAGE gel. The arrow indicated specific band for strain A of gynogenetic silver crucian carp; 4. LDH electrophoretic patterns on 4% - 15% PAGE gel; 5. MDH electrophoretic patterns on 4% - 15% PAGE gel; 6. Electrophoretogram of 2 typical RAPD products obtained from Opj - 6 and Opj - 12