

用 RAPD 技术检测野生鲫鱼和四个金鱼 代表品种的基因组 DNA 多态性

王晓梅^① 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳^②

(南开大学生物系, 天津 300071)

摘要 利用随机扩增多态 DNA 技术检测了两个不同地区的野生鲫鱼 (*Carassius auratus* L.) 和 4 个金鱼 (*Carassius auratus* Var.) 代表品种的基因组 DNA 的多态性。用 26 个随机引物对各品种实验鱼的基因组 DNA 进行扩增, 平均每个品种观察到约 134 个标记, 单个引物获得的标记在 1~16 个之间。实验结果经统计学分析表明, 金鱼和鲫鱼的随机扩增多态 DNA 共享度高, 进一步证实了金鱼由野生鲫鱼演化而来, 聚类结果表明, 草金鱼形成后, 首先演化为文种鱼, 然后由文种再形成龙种和蛋种两个品系。

关键词 鲫鱼, 金鱼, RAPD, 系统演化

分类号 Q349, Q953

Detection of the Genomic DNA Polymorphisms in the Wild Crucian and Four Representative Varieties of Goldfish Using RAPD Technique

WANG Xiaomei SONG Wenqin LI Xiulan CHEN Ruiyang

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Genomic DNA polymorphisms in the wild crucian from two different areas and in four representative varieties of goldfish were detected by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. The genomic DNA of each variety of fish was amplified with 26 primers. On average, about 134 RAPD markers were observed by each variety. The markers obtained by a single primer varied from 1 to 16. The statistical analysis of the experimental results indicated that random amplified polymorphic DNA of the goldfish and wild crucian have a high proportion of random amplified polymorphic DNA fragment shared. This further verified that goldfish is evolved from wild crucian. The cluster analysis suggested that after emerging, grass goldfish is evolved to wen goldfish, then through wen goldfish evolved to dragoneye goldfish and oval goldfish.

Key words Wild crucian, Goldfish, RAPD, Systematic evolution

金鱼是世界著名的观赏鱼类之一, 它以其绚丽的色彩、优美的体态以及典雅的游姿深受人们的喜爱。体态奇异的金鱼与江河湖泊中的野生鱼类有着极大的不同, 在自然水域找不到它的踪影, 它是人工饲养的产物。但据史料记载, 金鱼起源于中国的野生鲫鱼, 根据这一历史记载, 前人已从多方面进行研究, 发现鲫鱼可和任何品种的金鱼进行杂交^[1]; 金鱼和鲫鱼的各期胚胎发育不仅形态相似, 且同温下胚胎发育速度相同^[2]; 染色体数目相同、形态相似^[3]; 金鱼和鲫鱼同组织中的酯酶及乳酸脱氢酶同工酶谱带基本相同^[4~6]; 金鱼和鲫鱼的肌肉蛋

^①天津农学院水产系教师, 在职研究生。

^②通讯联系人。

白电泳的基本谱带相似⁽⁷⁾。这些实验结果均科学地证实了金鱼起源于鲫鱼，二者属于同一物种。但前人对金鱼品种内的系统演化关系至今尚未取得一致意见。

自 Williams 和 Welsh (1990) 创立 RAPD 技术以来，已广泛用于基因组研究的各个方面，RAPD 技术对未知基因序列的物种的品种鉴定及物种的亲缘关系和进化方面的研究有着独到之处。近年来，国内外已有许多报道利用 RAPD 技术对一些动植物的遗传多样性进行研究，在动物方面如对原生动物⁽⁸⁾、鼠⁽⁹⁾、滇金丝猴⁽¹⁰⁾、蛇⁽¹¹⁾均有报道，但用 RAPD 方法对鱼类进行研究报道较少⁽¹²⁾。本文在前人研究的基础上，利用 RAPD 技术，并辅以适当的统计分析，对鲫鱼和金鱼主要代表品种的基因组 DNA 进行多态性分析，在 DNA 分子水平上为金鱼的起源提供新的佐证，同时进一步深入探讨了金鱼主要品种的系统演化关系。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 野生鲫鱼分别采自天津市蓟县于桥水库和天津市西青区南河镇境内的独流碱河，金鱼来自天津市北辰区多助养殖场，按新的五类分类法⁽¹³⁾，金鱼选取草金种、文种、龙种和蛋种 4 大类的代表品种。实验鱼经鉴定后取出肝脏，置于-20℃备用(见表 1)。

1.1.2 随机引物由美国哥伦比亚大学合成，香港大学动物系孙梅博士惠赠。

表 1 野生鲫鱼和 4 个金鱼代表品种

品 种	野生鲫鱼		红草金鱼	红文鱼	红龙睛鱼	红泡眼鱼
	于桥水库	独流碱河				
个体数	10	10	10	10	10	10
平均体重(g)	127.2	75.7	23.4	9.4	16.5	14.4
年 龄	1 ⁺					

注：为叙述方便，将鲫鱼也称为一个品种；各品种的金鱼英文名称来自罗莉中(1982)、傅仪远(1987)和梁前进(1994)。

1.2 基因组 DNA 的提取

将实验鱼肝脏 0.2~0.5mg 在液氮中研成粉末转至 5ml Eppendorf 管中，加 2ml DNA 提取缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 75 mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 5 mmol/L EDTA)，于 65℃ 保温 10 分钟，加等体积的酚、氯仿(1:1)抽提数次，取上清液加入两倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，干燥后用适量的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解，再经 RNase 及蛋白酶 K 处理后置冰箱备用。

1.3 PCR 扩增

RAPD 扩增的基本条件是：PCR 反应体系为 25μl，其中含有 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50 mmol/L KCl, 0.3μmol/L 引物，200μmol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂, 20~40 ng 基因组 DNA, 1.5U Taq DNA 聚合酶(北京高登沃德生物制品有限公司)。反应混合物用石蜡油覆盖。DNA 扩增采用 Progene PCR 循环仪(英国 Techne 公司)。每个反应为 40 个循环，前 8 个循环 94℃ 变性 1min, 36℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min; 后 32 个循环 94℃ 变性 30s, 36℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min; 首次循环前 97℃ 变性 5min, 最后循环后 72℃ 再延伸 8min。每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照。

1.4 电泳

RAPD 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分离(0.5 × TBE, 3V/cm 恒压)，溴化乙啶染色后，紫外透射仪上观察和拍照。

1.5 数据分析

任意两个品种间的遗传距离(P)根据两个品种的共享度(F)来计算⁽¹⁰⁾：

$$P = 1 - F; F = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

N_a 和 N_b 分别为 a, b 品种拥有的 RAPD 标记数, N_{ab} 为 a, b 两个品种共同拥有的 RAPD 标记数。根据遗传距离 P 值, 再用类平均法^[14] 求出类间距离后再聚类。

2 结 果

2.1 RAPD 扩增结果

我们采用了 50 个随机引物进行扩增, 选取其中 26 个引物扩增产物电泳带型清晰的用于数据统计, 实验中这 26 个引物在各品种实验鱼中平均获得约 134 条带(标记), 每个引物平均提供约 5.2 个标记, 单个的引物扩增出的 RAPD 标记在 1~16 个之间(表 2)。图 1 列举了几个引物扩增产物的电泳带数。

表 2 随机引物序列及扩增结果

引物号	5'—3'序列	扩增带数	引物号	5'—3'序列	扩增带数
231	AGGGAGTTCC	3	266	CCACTCACCG	1
232	CGGTGACATC	4	268	AGGCCGCTTA	7
234*	TCCACGGACG	3~6	270	TCCGCGCGGG	8
238*	CTGTCCAGCA	9~14	271*	GCCATCAAGA	7~15
239	CTGAAGCGGA	3	274	GTTCCCGAGT	4
243	GGGTGAACCG	4	275	CCGGGCAAGC	2
246*	TATGGTCCGG	7~9	276	AGGATCAAGC	5
247*	TACCGACGGA	2~4	277	AGGAAGGTGC	4
248	GAGTAAGCGG	5	285*	GGGCGCCTAG	6~11
253	CCGTGCAGTA	2	286	CGGAGCCGGC	2
256*	TGCAGTCGAA	10~16	292	AAACAGCCCG	3
257	CGTCACCGTT	5	296	CCGCTGGGAG	4
262*	CGCCCCCAGT	7~11	298	CCGTACGGAC	3

注: 加“*”的引物为扩增带型在各品种间表现出多态性的引物。

2.2 数据统计结果

鲫鱼和金鱼 4 个代表品种的 RAPD 标记变异较小, 在 26 个引物中有 18 个引物的扩增带型在所有品种中没有差异, 只有 8 个引物(占引物的 30.8%)的扩增带型在各品种间表现出多态性。在每个品种检测到的 134 个标记中, 有 95 个标记(70.8%)在所有品种中表现为单型性, 任意两个品种间平均约有 116 条扩增带(86%)相同。表 3 列出了实验鱼各品种检测到的 RAPD 标记数及各品种间的遗传距离。用类平均法求出类间距离后聚类, 其结果见图 2。

表 3 各品种间的遗传距离

品种及 序号	于桥水库 野生鲫鱼 1	独流碱河 野生鲫鱼 2	红草金鱼 3	红文鱼 4	红龙睛鱼 5	红泡眼鱼 6
于桥水库野生鲫鱼 1	140					
独流碱河野生鲫鱼 2	0.097	128				
红草金鱼 3	0.1471	0.1462	132			
红文鱼 4	0.1618	0.1615	0.1288	132		
红龙睛鱼 5	0.1913	0.1623	0.1078	0.1152	137	
红泡眼鱼 6	0.1900	0.1760	0.1218	0.1218	0.087	139

注: 对角线上数字为每个品种所检测到的 RAPD 标记数。

3 讨 论

前人从形态学、细胞学、及同工酶和蛋白质等方面对金鱼的起源和演化进行了大量研究工作^[15], 但这些方面实验所得到的标记是基因表达加工后的产物, 可能受生物发育阶段及环境条件的影响, 而我们采用的 RAPD 技术, 研究的是遗传物质本身, 因此克服了上述缺点。DNA 不仅是主要的遗传物质, 同时也是生物进化史的重

要记录者，它含有无比丰富的进化信息。生物的亲缘关系越近，基因组内的同源序列越多，用相同引物扩增的产物的共有标记就越多，因此，由 RAPD 技术所得到的随机扩增多态 DNA 的共享度从一个方面反应了物种间亲缘关系的远近程度。

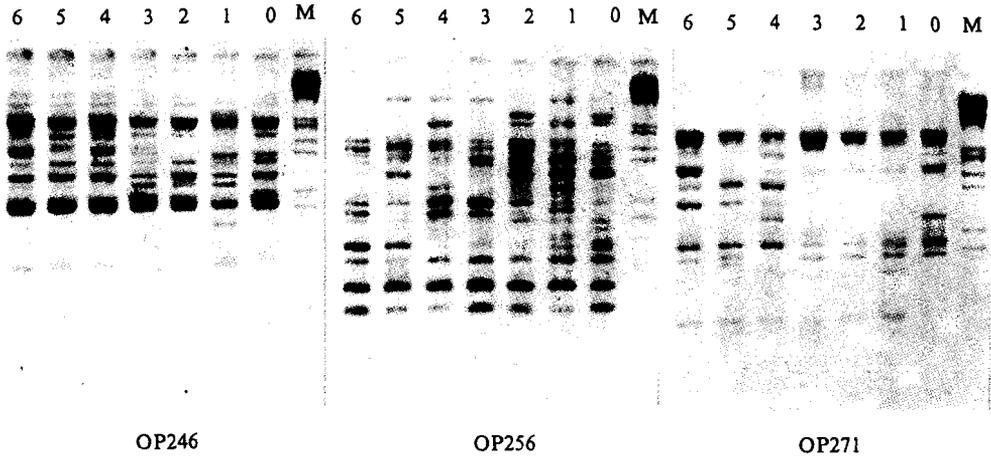


图 1 野生鲫鱼和金鱼基因组 DNA 以 246、256 和 271 号引物 RAPD 扩增产物电泳结果
M. DNA-EcoRI / HindIII 分子量标记; 0. 异育银鲫; 1~6. 代表的鱼类品种与表 3 同。

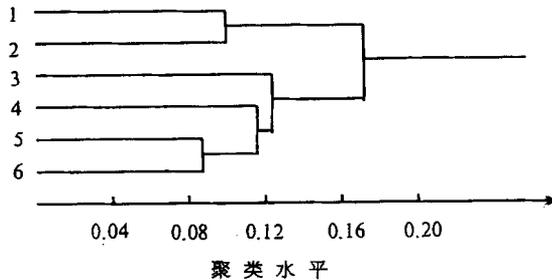


图 2 野生鲫鱼和 4 个金鱼代表品种的聚类图
序号代表的鱼类品种与表 3 同。

实验结果(表 3)表明，4 个金鱼代表品种与鲫鱼的遗传距离均小，在 0.1462~0.1913 之间，即共享度较高，这一结果，在 DNA 分子水平上进一步证实了金鱼起源于鲫鱼。从表 3 我们还以看出，同一品种的金鱼与不同地区的鲫鱼的遗传距离不同，但 4 个品种的金鱼均是与独流碱河鲫鱼的遗传距离小于于桥水库鲫鱼（这说明不同地理种群鲫鱼的遗传物质的差异性，关于不同种群的野生鲫鱼的 RAPD 标记差异将另文报道），并且在 4 个品种的金鱼与两个地区的野生鲫鱼的遗传距离，均是草金鱼与之最小，所以亲缘关系最近，这一结果支持了红文鱼（文种）、红龙睛鱼（龙种）、红泡眼鱼（蛋种）由草金鱼演变而来的结论^[16,17]。经进一步的统计分析从聚类结果（图 2），我们认为，草金鱼形成后，首先演化为文种品系，然后由文种再演化为两个亲缘关系很近的龙种和蛋种（首先聚为一类），金鱼的系统演化关系见图 3。

金鱼从被发现至今，走过了很长的演化历程，加之自然和社会经济条件的制约，经历了池养、盆养和有意识的人工选择及育种阶段，金鱼与其祖先相比，体型体态、生理生化特性均有不同程度的变化，这些均与 DNA 序列变异有关。从实验结果（图 1）我们可以看出，用相同引物扩增鲫鱼和金鱼基因组 DNA 产生的 RAPD 标记，虽然大多数带型相似，但有的分子量标记相同的 RAPD 标记，在鲫鱼和金鱼上的强度不同，也有的标记为金鱼或部分金鱼品种所特有，还有一些标记为鲫鱼所特有，这些差异均是 DNA 序列变化的结果。DNA 序列的

变化, 使金鱼与鲫鱼相比某些基因产生了突变, 此外, 加上二者的生活环境及饲养方式的不同, 使金鱼和鲫鱼不仅在基因序列, 同时可能在基因的表达、产物的加工过程都存在着差异, 这才使得同一物种的金鱼和鲫鱼表现出了完全不同的形态性状, 对于这一问题我们将作进一步深入探讨。

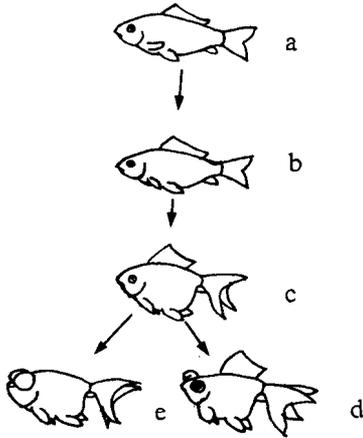


图3 金鱼的系统演化

a. 野生鲫鱼(Wild crucian); b. 草金鱼(Grass goldfish);
c. 文种鱼(Wen goldfish); d. 龙种鱼(Dragoneye goldfish);
e. 蛋种鱼(Oval goldfish)

参 考 文 献

- 1 陈 桢. 金鱼家化史与品种形成因素. 动物学报, 1954, 6(2): 89~116
- 2 李 璞等. 鲫鱼和金鱼胚胎发育的分期. 动物学报, 1959, 11(2): 145~154
- 3 王春元等. 金鱼染色体组型的研究 I. 遗传学报, 1982, 9 (3): 238~242
- 4 罗莉中等. 金鱼乳酸脱氢酶同工酶的发生遗传学研究 I. 遗传学报, 1982, 9 (5): 375~380
- 5 罗莉中. 金鱼乳酸脱氢酶同工酶的发生遗传学研究2. 遗传学报, 1984, 11 (6): 487~489
- 6 王春元等. 金鱼酯酶同工酶的研究. 遗传学报, 1988, 15 (6): 442~449
- 7 梁前进等. 野生鲫鱼和五个金鱼代表品种的肌肉蛋白电泳分析. 动物学研究, 1994, 15 (2): 68~75
- 8 Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Genetic F. Characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Rorc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 1335~1739
- 9 Welsh J, Peterson C, Moclelland M. Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and generic mapping. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(2): 303~306
- 10 兰 宏等. 滇金丝猴的随机扩增多态DNA遗传多样性分析. 中国科学 (C辑), 1996, 26 (3): 244~249
- 11 王义权等. 用RAPD技术检测六种蛇基因组DNA多态性. 动物学报, 1996, 42 (2): 172~181
- 12 陈 洪等. RAPD技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用. 科学通报, 1994, 39 (7): 661~663
- 13 傅仪远, 伍惠生. 中国金鱼. 天津: 天津科学技术出版社, 1987
- 14 潘恩沛等. 多元统计程序集. 北京: 原子能出版社, 1984
- 15 王春元. 金鱼的起源. 生物学通报, 1985, 12: 11~13
- 16 王春元. 我国现有的金鱼品种的分类及其系统发育的探讨. 动物学报, 1983, 29 (3): 267~277
- 17 李 璞. 我国金鱼的品种及其在系统发生上的关系. 动物学杂志, 1959, 6: 248~251

1997-10-15 收稿, 1997-12-28 修回.

欢迎订阅 1999 年《中国畜牧杂志》

《中国畜牧杂志》系中国畜牧兽医学会主办, 中国农业大学动物科技学院编辑出版的畜牧综合性科技期刊, 国内外公开发行。本刊为双月刊, 每期 64 页, 定价 3.00 元, 邮订代号: 82-147, 您可到当地邮局(所)办理邮订; 如有漏订, 请直接与本编辑部联系。地址: 100094 北京圆明园西路 2 号 中国农业大学动物科技学院内