

# 兴国红鲤和散鳞镜鲤杂种优势的 RAPD 分析

董在杰 夏德全 吴婷婷 杨弘 徐跑

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

**摘要** 运用随机扩增多态 DNA 方法对兴国红鲤、苏联镜鲤、德国镜鲤及它们的杂交后代进行遗传分析。结果表明:兴国红鲤与苏联镜鲤的杂交子一代接受双亲的遗传物质是相等的,而兴国红鲤与德国镜鲤的杂交子一代接受父本的遗传物质稍多一些。计算了两组杂交子一代的多态性位点比例和平均杂合度,兴国红鲤和苏联镜鲤杂种一代的多态性位点比例为0.3684,平均杂合度0.1487;兴国红鲤与德国镜鲤杂种一代的多态性位点比例为0.3737,平均杂合度为0.1499。说明两组杂交子一代的多态性位点比例和平均杂合度基本上没有差异。兴国红鲤和苏联镜鲤杂交子一代的杂种优势可以用杂种优势理论中的显性假说来解释。

**关键词** 随机扩增多态 DNA, 兴国红鲤, 散鳞镜鲤, 杂种一代, 杂种优势

**中图分类号** Q953

杂种优势机理及预测的研究在作物上进行得较多。育种学家最初是用数量遗传学的方法即通过对配合力和遗传距离的测定来预测杂种优势,这需要大量的组合,花费大量的时间和人力,具有很大的局限性。随着 DNA 分子标记差异性在作物杂种优势预测领域的广泛应用,作物杂种优势预测的研究进入了一个崭新的阶段[李春丽 1997]。在鱼类上则未见这方面的报道。兴国红鲤×散鳞镜鲤杂交产生的丰鲤是鲤不同品种杂交获得的具有明显杂种优势的杂种一代[张兴忠等 1988]。这一杂交组合中的父本是我国50年代从前苏联引种的镜鲤(下称苏联镜鲤),如果以从德国引种的镜鲤(下称德国镜鲤)作为父本与母本兴国红鲤杂交是否也会产生明显的杂种优势,我们对此进行分析,研究杂种优势产生的分子生物学基础。现已运用了随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)方法分析兴国红鲤、苏联镜鲤和德国镜鲤这三个亲本间的遗传距离与杂种优势之间的关系,结果显示兴国红鲤与苏联镜鲤之间遗传距离较大。由于在一定遗传距离范围内,遗传距离较大的两个品种间的杂种优势较强,所以从分子水平证明了这两个群体间杂交可产生较强的杂种优势[Dong 和 Zhou 1998]。本文运用 RAPD 方法进一步从杂种一代与亲本间的关系上探讨杂种优势的分子生物学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验鱼

兴国红鲤(R)、德国镜鲤(Mg)和苏联镜鲤(Mr)均引自长江水产研究所,规格见表1。在鲤繁殖季节,用鲤脑垂体进行人工催产,进行两组杂交试验:①兴国红鲤♀×苏联镜鲤♂(Fr);②兴国红鲤♀×德国镜鲤♂(Fg)。鱼苗孵出后,分池饲养。

表1 本实验所用的实验鱼

Tab. 1 Experimental fish used in the present experiment

实验鱼	尾数	性别	体长(厘米)	体重(克)
兴国红鲤	4	雌	27.3~29.1	486~510
苏联镜鲤	3	雄	28.5~29.6	467~482
德国镜鲤	3	雄	27.6~29.4	462~479

### 1.2 随机引物

购自上海生工生物工程公司。引物的长度为10个核苷酸,序列见表2。

表2 随机引物序列和各引物的子代与亲本间相似系数

Tab. 2 Sequence of the random primers and similarity index for each primer between the filial generation and parental stock

引物	序列(5'→3')	Fr/R	Fr/Mr	Fg/R	Fg/Mg
S284	GGCTGCAATG	0.818	0.821	0.795	0.807
S285	GGCTGCGACA	0.943	0.933	0.901	0.901
S286	AAGGCTCACC	0.944	1.000	0.944	0.944
S287	AGAGCCGTCA	0.901	0.947	0.768	0.820
S289	AGCAGCGCAC	0.854	0.849	0.821	0.837
S290	CAAACGTGGG	0.913	0.927	0.901	0.927
S299	TGAGGGTCCC	0.821	0.707	0.745	0.853
S300	AGCCGTGGAA	0.701	0.585	0.795	0.871
S465	CCCCGGTAAC	0.583	0.711	0.773	0.849
S467	GTCCATGCCA	0.880	0.795	0.929	0.841
S468	ACATCGCCCA	0.831	0.873	0.881	0.902
S469	GTGGTCCGCA	0.853	0.790	0.756	0.885
S471	AACGCGTCGG	0.684	0.675	0.688	0.759
S472	AAGGGCGAGT	0.955	1.000	0.935	0.912
S474	CCAGCCGAAC	0.938	0.910	0.827	0.874
S475	GGAAGCCAAC	0.733	0.725	0.929	0.920
S477	TGACCCGCCT	0.900	0.900	0.913	0.924
平均值±		0.838±	0.832±	0.841±	0.872±
SD		0.106	0.120	0.080	0.050

### 1.3 实验鱼基因组DNA的提取

实验鱼尾静脉抽血,ACD抗凝,取30μl全血置于470μl SET(0.15M NaCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)中,加SDS和蛋白酶K分别至终浓度0.5%和200μg/ml,55℃水浴消化过夜,用等体积饱和酚抽取两次,再分别用等体积酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇各抽取一次,无水乙醇沉淀,加适量TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)于55℃水浴溶解DNA。

## 1.4 PCR 反应

所用试剂均购自华美公司,反应总体积为25 $\mu$ l。其中含:10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 15ng 引物,1.5单位 Taq 酶,20ng 模板 DNA。阴性对照不加模板 DNA。于反应混合物上加约25 $\mu$ l 矿物油,在 P. E. 480 型 PCR 扩增仪上进行扩增反应。扩增反应参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性5分钟,然后在94 $^{\circ}$ C 变性1分钟,36 $^{\circ}$ C 退火1分钟,72 $^{\circ}$ C 延伸2分钟,反应循环45次,最后在72 $^{\circ}$ C 延伸10分钟。扩增产物用含溴化乙锭的1.4%的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察拍照。

## 1.5 统计方法

所有标记的统计均以带存在为1,带不存在为0。

按 Lynch[1990]的方法计算群体间相似系数。

个体间相似系数  $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$

其中, $n_{xy}$ 是个体 x 和 y 共有条带数, $n_x$ 和  $n_y$  分别是个体 x 和个体 y 所扩增出的条带数。

群体间相似系数  $S_{ij}$ 是从群体 i 和群体 j 中随机配对的两个体的相似系数的平均数。

根据 Apostol 等[1996]假设,将 RAPD 标记作为等位基因进行多态性分析。以纯合隐性个体频率的平方根来计算隐性等位基因 a 的基因频率 q,显性等位基因 A 的基因频率  $p = 1 - q$ 。多态位点比例  $p = \text{多态扩增片段} / \text{扩增片段总数}$ 。群体的平均杂合度:

$$H = \sum (1 - \sum p_i^2) / n$$

其中, $p_i$  是第 i 个等位基因的频率。

## 2 结果

(1)在20个引物中有17个引物产生稳定清晰的条带,共扩增出104条带,平均每个引物扩增出6.1条带,其中多态性条带为63条,占60.6%。扩增片段大小在300~2600bp 之间(图1)。从

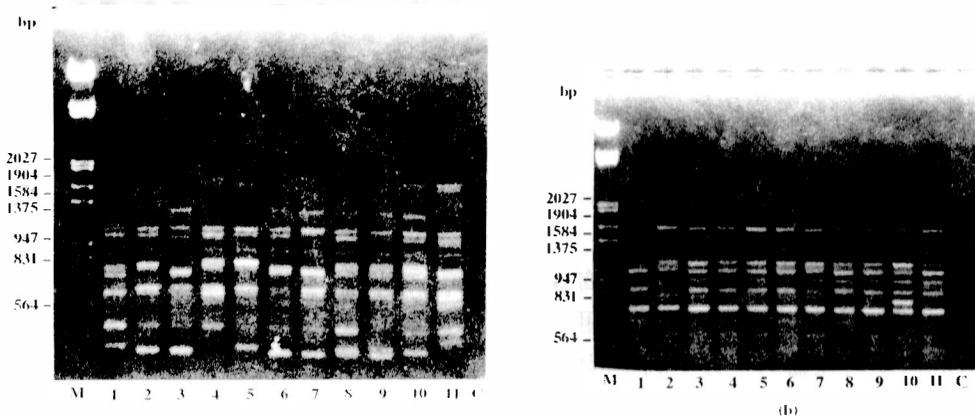


图1 用引物 S471(a)和 S469(b)扩增的鲤的 RAPD 图谱  
Fig.1 RAPD patterns of carps using primer S471(a) and S469(b)

M:DNA 分子量标记;C:阴性对照。

(a)1-4:兴国红鲤,5-8:兴国红鲤×苏联镜鲤,9-11:苏联镜鲤。

(b)1-4:兴国红鲤,5-8:兴国红鲤×德国镜鲤,9-11:德国镜鲤。

图1中可看出:两组杂交亲本的扩增片段均在它们的杂交子代中出现。

(2)各引物的子代与亲代间的相似系数见表2。从表2可以看出,对于兴国红鲤♀×苏联镜鲤♂这一杂交组合,在17个引物中,有9.5个表现为子代与母本有较大相似系数(S285, S289, S299, S300, S467, S469, S471, S474, S475。若某个引物表现子代与亲本相似系数相等,则各算0.5个。S477即如此),有7.5个表现为子代与父本有较大相似系数(S284, S286, S287, S290, S465, S468, S472。S477按0.5个计算);而对于兴国红鲤×德国镜鲤这一杂交组合,在17个引物中,表现子代与母本有较大相似系数的有4个(S467, S472, S475。S285和S286各按0.5个计算),表现子代与父本有较大相似系数的有13个(S284, S287, S289, S290, S299, S300, S465, S468, S469, S471, S474, S477。S285和S286各按0.5个计算)。我们把子代与亲本有较大相似系数的机率是相等的作为零假设,即在17个引物中,各有8.5个引物表现为子代与母本及子代与父本有较大相似系数。通过 $\chi^2$ 检验[杜荣骞 1985],第一个组合的 $\chi^2=0.2353$  ( $P>0.05$ ),接受零假设。此结果表明子代与两亲本的相似程度是相同的;第二个组合的 $\chi^2=4.7647$  ( $P<0.05$ ),拒绝零假设。这说明子代与两亲本的相似性有差异,偏向于父本。在表2中,兴国红鲤♀与苏联镜鲤♂的杂交子一代与母本兴国红鲤的平均相似系数为0.838,与父本苏联镜鲤的平均相似系数为0.832;兴国红鲤♀与德国镜鲤♂的杂交子一代与母本的平均相似系数为0.841,与父本德国镜鲤的平均相似系数为0.872。从这一结果也可以看出,兴国红鲤与苏联镜鲤的杂种一代与双亲的相似程度是相同的,而兴国红鲤和德国镜鲤的杂种一代与父本的相似性稍大一些。

(3)兴国红鲤和德国镜鲤杂种一代的多态位点比例为0.3737,平均杂合度为0.1499;兴国红鲤与苏联镜鲤杂种一代的多态位点比例为0.3684,平均杂合度为0.1487。由此可见,两组杂交子一代的多态位点比例和平均杂合度基本上没有差异。

### 3 讨论

(1)我们的实验结果表明,兴国红鲤和苏联镜鲤的杂交子一代与母本及父本的遗传相似程度基本上是相同的(分别为0.838和0.832),说明其杂种一代接受双亲的遗传物质是相等的。由于生物体的性状是由它的遗传物质决定的,所以兴国红鲤与苏联镜鲤的杂种一代(丰鲤)的形态性状有的象母本(如鳞型、侧线鳞等),有的象父本(如体色、背鳍等),有的介于两亲本之间(如脊椎骨等)[湖北省水生生物研究所 1975],从总体上看,是父本和母本的中间型,而不偏向某一亲本。兴国红鲤和苏联镜鲤的杂种一代中含有相等的双亲遗传物质,并且来自父本的基因与来自母本的基因发挥作用的大小很可能是相等的,因而使杂种一代的性状各有一半表现为相似于母本和父本。当杂种一代表现的是母本和父本的显性优良性状时,杂种优势就显现出来了。而兴国红鲤与德国镜鲤的杂交子一代与父本的遗传相似性大一些(0.872,与母本为0.841),所以杂种一代接受父本的遗传物质多一些,这样它的生长发育过程受到父本基因的调控多一些。或许双亲的基因共同调控作用对杂种一代的生长发育更加有利一些,因为这样可以使一方有利的基因掩盖另一方不利基因的表达。因而以德国镜鲤为父本的杂种一代的杂种优势不及以苏联镜鲤为父本的杂种一代。

(2)通过分析亲本间的遗传距离及杂交子一代与亲本的遗传关系,我们初步探讨兴国红鲤和苏联镜鲤杂交产生杂种优势的分子生物学基础:首先,在兴国红鲤、苏联镜鲤和德国镜鲤这三个群体中,兴国红鲤和苏联镜鲤之间的遗传距离较远[Dong 和 Zhou 1998],而在一定范围

内,遗传距离较大的品种间可以产生较强的杂种优势,因而它们有产生杂种优势的基础;其次,它们的杂种一代继承了父母的各一半遗传物质,并且这些遗传物质很可能都是表现父母显性优良性状的。根据杂种优势理论中的显性假说,生物在长期的自然选择作用下,显性基因大都对生长发育有利,而相对的隐性基因大都对生长发育不利。杂种优势就是因为杂交可以把两个亲本对生长发育有利的显性基因累积于杂种一代中,因而有利的显性基因遮盖了隐性基因的不利作用,使所有的隐性基因都不能发生作用,而所有的显性基因都同时发生作用,它们共同发挥了综合的效应,所以杂种就表现出强大的杂种优势。

(3)杂种优势理论中还有一个超显性假说,这个假说认为杂种优势来源于杂合等位基因间的相互作用,因杂合等位基因具有不同的结构和功能,但并无显隐性关系,当它们彼此结合而发生相互作用时,就能促进生物体的旺盛代谢,而且基因杂合的位点越多,每对等位基因间作用的差异程度越大, $F_1$ 的杂种优势就越明显。我们计算了两组杂种一代的多态位点比例和平均杂合度,结果显示它们相差不大(多态性位点比例分别为0.3737和0.3684,平均杂合度分别为0.1499和0.1487)。所以兴国红鲤和苏联镜鲤间的杂种优势似乎不能用超显性假说来加以很好地解释。

## 参 考 文 献

- 杜荣寿. 1985. 生物统计学. 北京:高等教育出版社. 146~151
- 李春丽. 1997. 应用分子标记差异性预测作物杂种优势的研究进展. 遗传,19(1):46~48
- 张兴忠,仇潜如,陈曾龙等. 1988. 鱼类遗传与育种. 北京:农业出版社. 165~201
- 湖北省水生生物研究所. 1975. 散鳞镜鲤与兴国红鲤、龙州镜鲤的杂种优势以及鳞被、体色的遗传. 水生生物学集刊,5(4):439~448
- Apostol B L, Black IV W C, Reiter P, et al. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Heredity, 76: 325~334
- Dong Z, Zhou E. 1998. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture Research, 29:595~600
- Lynch M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. Molecular Biology and Evolution, 7:478~484

## RAPD ANALYSIS OF HETEROSIS BETWEEN XINGGUO RED CARP AND SCATTERED MIRROR CARP

DONG Zai-Jie, XIA De-Quan, WU Ting-Ting, YANG Hong, XU Pao  
(Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081)

**ABSTRACT** The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to the genetic analysis of Xingguo red carp (*Cyprinus carpio* var. *singuonensis*), Russian mirror carp, German mirror carp and their filial generations. 104 fragments were generated by using 17 10-mer primers, among which, 63 were polymorphic. The amplified bands of the filial generations could be found in their parents. In the combination of Xingguo red carp and Russian mirror carp, among 17 primers, 7.5 revealed the larger similarity indices between the filial generation and the paternal line, and 9.5 displayed larger similarity indices between the filial generation and the maternal line. In the combination of Xingguo red carp and German mirror carp, there were 13 and 4 primers, respectively. The result indicated that the filial generation of Xingguo red carp and Russian mirror carp inherited equal genetic material of the paternal fish. But the filial generation of Xingguo red carp and German mirror carp inherited a little more genetic material from paternal fish than maternal fish. The ratio of polymorphic loci and average allelic heterozygosity in the filial generation of Xingguo red carp ♀ × Russian mirror carp ♂ and Xingguo red carp ♀ × German mirror carp ♂ were also calculated, and the values were 0.3684, 0.1487 and 0.3737, 0.1499, respectively. This result revealed that they were in the same degree. The heterosis of the filial generation of Xingguo red carp and Russian mirror carp could be explained by the dominance hypothesis.

**KEYWORDS** RAPD, *Cyprinus carpio* var. *singuonensis*, *Cyprinus carpio haematopterus*, filial generation, heterosis