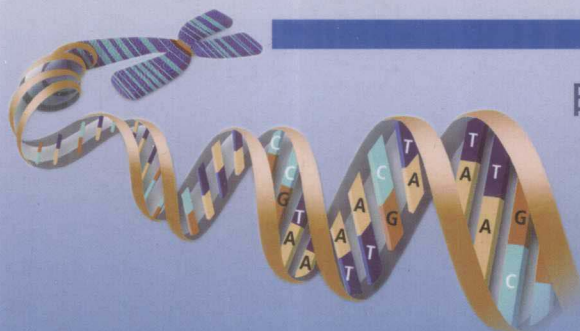


Molecule Identification Technique
for Fish Genetic Resources

鱼类种质 分子鉴定技术

白俊杰等 著



鱼类种质分子鉴定技术

Molecule Identification Technique for Fish Genetic Resources

白俊杰等 著

海洋出版社

2011 年 · 北京

内 容 简 介

本书较系统地反映了鱼类种质分子鉴别方面的研究成果,是国内外第一部研究鱼类种质分子鉴定的专著。全书共分五章,第一章概述主要介绍鱼类种质鉴定的方法以及分子标记在种质检测方面的研究进展;第二章介绍罗非鱼、大口黑鲈和剑尾鱼微卫星 DNA 指纹图谱的构建和 DNA 指纹计算机的数字化鉴定技术;第三章收录了几种鱼类的品种,品系间特异性分子标记的筛选和鉴定结果;第四章是基于线粒体 DNA 序列的鱼类种质鉴定与系统分化研究;第五章是一些鱼类的遗传结构和品种以及种群间遗传差异分析。

本书可供从事水产种质资源、遗传育种、生物技术研究的科技、教学人员以及相关专业的本科生和研究生阅读参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

鱼类种质分子鉴定技术/白俊杰等著. —北京:海洋出版社,2011.1
ISBN 978 - 7 - 5027 - 7933 - 7

I. ①鱼… II. ①白… III. ①鱼类 - 种质资源 - 鉴定
IV. ①S962

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 236691 号

责任编辑:方 菁

责任印制:刘志恒

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编:100081

北京画中画印刷有限公司印刷 新华书店发行所经销

2011 年 1 月第 1 版 2011 年 1 月北京第 1 次印刷

开本:787mm × 1092mm 1/16 印张:15.75 彩插 16 面

字数:300 千字 定价:80.00 元

发行部:62147016 邮购部:68038093 总编室:62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

序

在水产种质资源的保护和利用的工作中，如何加强水产种质的检测和监测能力，完善种质检测技术是确保水产种质资源的合理利用的重要保障。目前鱼类种质的鉴定和评价是从表型和遗传型两方面来进行，主要包括从形态（个体水平）、养殖性能（群体水平）、染色体（细胞水平）、同工酶及 DNA 分析等给予判定。我国目前鉴定水产种质纯度及真伪的常规方法是形态性状和染色体组型分析，养殖性能检测由于时间长，对场地和环境条件要求高，并且成本很高而较少采用。同工酶和蛋白电泳等方法也可进行部分品种的快速检测，但同工酶和蛋白电泳能够检测的位点有限，多态性不够多，对亲缘关系较近和遗传基础较复杂的品种难以鉴别，亟待开发和建立新的，并能快速准确鉴定水产种质的技术。

DNA 分子标记检测生物间的差异，是 DNA 水平遗传变异的直接反映。与形态标记、细胞标记和生化标记等表型标记相比较，DNA 分子标记具有能对各发育时期的个体、各个组织、器官甚至细胞做检测，既不受环境影响，也不受基因表达与否的限制，数量丰富、遗传稳定以及操作简便等特点，使得其在种质鉴定方面具有广泛的应用前景。

中国水产科学研究院珠江水产研究所白俊杰研究员及其所带领的团队在淡水鱼类种质的分子鉴定研究方面做了大量的工作，他们采用 DNA 分子标记技术，以种质鉴定中具有代表性的鱼类为研究对象，从 DNA 指纹图谱、特异微卫星标记、系统分子分类以及线粒体 DNA 序列和功能基因序列等多层次多技术建立了鱼类种质的分子鉴定方法，系统地探讨了鱼类种质的分子鉴定的理论和技术，取得了丰硕的成果，专著《鱼类种质分子鉴定技术》正是他们辛勤劳动的结晶。

该书的出版将为鱼类的种质鉴定提供有效的技术方法，填补我国此类研究空白，推动我国水产种质鉴定相关技术的发展，也是对现有水产原种、良种种质检测方法的重要补充，适合作为水产种质资源管理人员、科研人员以及相关专业学生的参考书。

中国工程院院士 中山大学教授

林浩然

前 言

种质资源是我国水产养殖发展的战略资源，它是水产育种、养殖生产和渔业科技发展的重要物质基础。怎样提升水产种质的检测和监测能力是确保水产种质资源合理利用的重要保障。传统的水产种质鉴定和评价主要采用形态学、细胞学和生化分析等给予判定，养殖性能检测由于所需时间一般较长，环境条件对养殖效果影响较大，成本很高等因素，加上目前国家还没有出台养殖性能评价的标准而较少采用。

由于缺乏有效的技术手段，我国绝大多数养殖鱼类的遗传背景不清楚，野生原种和人工养殖群体缺乏有效的鉴定标准，普通群体和人工培育的良种也不能很好地加以区分，导致渔业生产中种质混杂严重，这一问题已成为我国水产养殖中的一个重要的制约因素，也成为水产科技工作者亟待研究解决的重要课题。

为此，我们从“十五”开始，在国家科技基础条件平台建设项目、国家支撑计划、引进国际先进农业科学技术计划、公益性行业（农业）科研专项、广东省科技计划项目以及广东省海洋渔业科技推广项目的资助下，以种质鉴定中具有代表性的鱼类为研究对象，开展了种质分子鉴定研究，本书正是其中部分研究结果的汇集。作为国内外第一部研究鱼类种质分子鉴定的专著，相信本书的出版将给从事水产种质鉴定和监测的工作者带来裨益，也为其他养殖品种的分子鉴定提供借鉴。然而当今分子生物学技术日新月异，分子鉴定技术尚处于初级阶段，我们的研究亦不够系统和深入，加上作者水平有限，错漏在所难免，敬请广大读者批评指正。

全书共分五章，第一章概述主要介绍了鱼类种质鉴定的方法以及分子标记在种质检测方面的研究进展；第二章是几种鱼类微卫星 DNA 指纹

图谱的构建和计算机的数字化鉴定技术；第三章收录了我们在罗非鱼、大口黑鲈和剑尾鱼等品系，品系间特异隆分子标记的筛选和鉴定结果；第四章是基于线粒体 DNA 序列的鱼类种质鉴定与系统分化研究；第五章是一些鱼类的遗传结构和品种、种群间遗传差异分析。主要编著人员为：白俊杰、宋红梅、刘宇飞、李胜杰、牟希东、张静、李霞、杨淞、全迎春、王培欣、潘阳、张庭、樊佳佳、何小燕、李榕、卢建峰等，另外参加编写的人员还有叶星、简清、罗建仁、劳海华、吴淑勤、于凌云、卢迈新、胡隐昌、陈昆慈、黄樟翰、李小慧、王海英、郑光明、马冬梅和高风英等，我们在每一节的最后列出了这一节的主要编著人员。书中鱼类的彩图主要由罗建仁研究员，卢迈新研究员和李凯彬副研究员等人提供。

最后我们要感谢中国工程院院士，中山大学林浩然教授在百忙中为我们的书作序，感谢李桂娴同学对本书初稿进行的校对。

白俊杰

2010 年 9 月

目 次

第一章 概 述	1
第一节 完善种质鉴定技术,确保我国水产种质资源的合理利用	1
第二节 鱼类品种的鉴定方法	3
第三节 鱼类标志技术的研究进展	13
第四节 分子标记在实验动物遗传监测中的应用	16
第二章 鱼类 DNA 指纹图谱的构建及其数字化鉴定技术	32
第一节 DNA 指纹图谱的研究进展	32
第二节 罗非鱼微卫星 DNA 指纹图谱的构建	37
第三节 大口黑鲈微卫星 DNA 指纹图谱的构建	44
第四节 水生实验动物剑尾鱼的 DNA 指纹图谱构建	51
第五节 罗非鱼微卫星 DNA 指纹的计算机化鉴定	57
第三章 鱼类品种特异分子标记的筛选和鉴定	66
第一节 尼罗、奥利亚和莫桑比克 3 种罗非鱼的特异微卫星分子标记的 筛选和应用	66
第二节 橙色莫桑比克罗非鱼和荷那龙罗非鱼的 AFLP 分析	71
第三节 5 个罗非鱼群体的遗传分析与 RAPD 分子标记	74
第四节 微卫星标记在 RR-B 系剑尾鱼遗传监测的应用	78
第五节 剑尾鱼 RR-B 系 RAPD 特异性标记的 SCAR 转化	85
第六节 利用微卫星多重 PCR 技术鉴定剑尾鱼 RR-B 系	90
第七节 微卫星 DNA 标记在大口黑鲈亲权鉴定的研究	94
第八节 我国养殖大口黑鲈的亚种分类地位鉴定	102
第九节 5 个金鱼群体的 RAPD 遗传结构及分类	107

第四章 基于线粒体 DNA 序列的鱼类种质鉴定与系统分化研究	116
第一节 线粒体 DNA 基因在鱼类种质鉴定中的应用	116
第二节 剑尾鱼 RR-B 系与野生型剑尾鱼线粒体 DNA 全序列的测定和比较	119
第三节 大口黑鲈北方亚种和佛罗里达亚种的线粒体 D-loop 区的序列差异分析	123
第四节 月鳢、斑鳢细胞色素 <i>b</i> 基因序列差异分析与鉴定	127
第五节 金鱼线粒体 DNA Cyt <i>b</i> 基因的测定	131
第六节 斗鱼属鱼类线粒体 Cyt <i>b</i> 基因的序列分析与分类鉴定	134
第七节 叉尾斗鱼 mtDNA D-loop 区序列的种群遗传变异与亲缘地理分析	138
第八节 盘丽鱼属鱼类线粒体 DNA Cyt <i>b</i> 基因的分子鉴定和遗传分化	147
第九节 盘丽鱼属鱼类 mtDNA D-loop 区的分子鉴定及分类探讨	153
第十节 金龙和红龙鱼线粒体 DNA D-loop 区序列的差异分析	156
第五章 鱼类遗传结构的分子标记研究	164
第一节 两个罗非鱼杂交群体及其子一代遗传结构的 AFLP 分析	164
第二节 4 个奥利亚罗非鱼群体微卫星遗传结构分析	168
第三节 大口黑鲈养殖群体遗传结构的 RAPD 分析	179
第四节 大口黑鲈养殖群体遗传结构的微卫星分析	182
第五节 微卫星分子标记对大口黑鲈选育中遗传结构的检测	189
第六节 大口黑鲈选育群体遗传结构的 AFLP 分析	195
第七节 剑尾鱼 RR-B 系遗传纯度的 RAPD 分析	200
第八节 RR-B 系剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选和与非选育系的差异分析	205
第九节 剑尾鱼 RW-H 近交系的遗传结构分析	211
第十节 剑尾鱼 RW-H 近交系 20 个微卫星座位的遗传结构	217

第一章 概 述

第一节 完善种质鉴定技术，确保我国 水产种质资源的合理利用

水生生物种质资源是生物种质资源的重要组成部分，它是水产育种、养殖生产和渔业科技发展的重要物质基础，也是支撑国民生产、人民生活和社会科技活动的重要战略资源，在国际竞争中，日显其重要地位。为加强水产种质资源的保护和利用，促进渔业的可持续发展，我国已将保护水产种质资源写进《渔业法》。农业部颁布实施的《水产苗种管理办法》明确指出国家将有计划地搜集、整理、鉴定、保护、保存和合理利用水产种质资源。可见研究、保护和利用好水产种质资源是我国渔业科技发展的重点之一。

水产养殖业与农业一样，优良的品种对于养殖产业的提高起着十分重要的作用，在其他条件一样的情况下，使用良种可增加产量 20% ~ 30%，是水产养殖业的重要基础。20 世纪 70 年代末以来，我国加大了对水产良种的培育力度，先后培育出一批新品种，这些优良品种先后被列入国家重点推广计划，大量应用于生产，取得了十分显著的经济效益和社会效益。为了进一步推动水产原良种体系建设，国家先后投资建设了一批国家级原良种场和省级原良种场，对优良品种进行遗传改良、提纯复壮。为保护和合理利用水产种质资源，加强水产品品种选育、苗种生产、经营和进出口管理，提高水产苗种质量，维护水产苗种生产者、经营者和使用者的合法权益，促进水产养殖业持续健康发展，根据我国渔业法和相关法律法规，农业部颁布实施了《水产苗种管理办法》，要求全国养殖的良种苗种必须来自国家和省级原良种场，或者由国家级、省级原良种场提供的原种良种，由苗种场繁育的苗种。农业部还成立了一批原良种质量监测机构，制定了《水产原种、良种种质检测规范》，这些为保证我国水产良种规划的实施起到了重要的作用。

在水产种质的保护和利用的工作中，如何加强我国水产种质的检测和监测能

力，完善种质检测技术是确保我国水产种质资源合理利用的重要保障。

目前我国鱼类种质的鉴定和评价是从表型和遗传型两方面来进行，主要包括从形态、养殖性能、染色体、同工酶及 DNA 分析等给予判定。目前鉴定水产种质纯度及真伪的常规方法是形态性状，养殖性能检测由于时间长，对场地和环境条件的一致性要求很高，并且成本较高而较少采用。同工酶和蛋白电泳等方法也可进行部分品种的快速检测，但同工酶和蛋白电泳能够检测的位点有限，多态性不够多，对亲缘关系较近和遗传基础较复杂的品种（包括目前已选育和培育的大多数水产养殖良种）难以鉴别。同时由于基因工程的发展，人们只需对新品种进行很小的改造，如改变一个基因就可带来很好的养殖效果，而这种改变往往不是表型可见的。因此，对于我国目前已培育的良种如：兴国红鲤、荷包红鲤、建鲤、德国镜鲤等多个鲤鱼选育品种，以及彭泽鲫、银鲫，选育后的罗非鱼、团头鲂、对虾、剑尾鱼等用传统的检测方法存在很大的局限性。对于杂交种的亲本如尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、荷包红鲤和元江鲤等是否种质已有混杂也是很难用传统的方法加以检测。亟待搞清楚这些原良种的遗传结构和背景，开发和建立一种新的、能快速鉴定原良种的技术。

DNA 是一切生命物质的遗传基础，决定着生物性状。不同物种的遗传差异在 DNA 水平上表现碱基序列的不同，这些不同通常是不会由于个体的生长和环境的改变而改变。20 世纪 80 年代以来，随着 DNA 重组、限制性内切酶消化、分子杂交、DNA 序列快速分析和 PCR 等一系列分子生物学实验技术的建立，使得人们能够较方便地检测和分析遗传物质的多态性，随之出现了建立在 DNA 水平上的分子遗传标记（molecular genetic marker）。DNA 分子标记大致分为三类：第一类是以 Southern 杂交技术为核心的分子标记；第二类是以 PCR 技术为核心的分子标记，这两类标记，基本上是以电泳条带的形式表现出来；第三类是以直接测序技术为核心的分子标记，表现形式为 DNA 片段的一级结构即碱基排序。DNA 分子标记在 DNA 分子上检测生物间的差异，是 DNA 水平遗传变异的直接反映，与形态标记、细胞标记和生化标记等表型标记相比较，DNA 分子标记具有能对各发育时期的个体、各个组织、器官甚至细胞做检测，既不受环境影响，也不受基因表达与否的限制，数量丰富，遗传稳定，对生物体的影响表现“中性”以及操作简便等特点（张四明，1997）。分子标记的所有这些特点使得它在种质分子鉴定方面得到广泛的应用（郭军，2000）。

目前，用于品种鉴定的分子标记技术主要是第二类和第三类分子标记。基于第二类分子标记主要有限制性内切酶片段长度多态性（RFLP）、随机扩增 DNA 多态性（RAPD）、扩增片段长度多态性（AFLP）、微卫星 DNA（SSR）等，从它们的多

态性和稳定性考虑,目前较实用的要属 SSR 技术(周岚等,2005)和由 RAPD 和 AFLP 等技术延伸而来的序列特异多态性(SCAR)技术(邹曙明等,2005)的鉴定方法。第三类分子标记在种质鉴定中较常使用的是线粒体 DNA 标记。线粒体 DNA(mtDNA)是核外遗传物质,它结构简单,一般无组织特异性,每个细胞含有多个拷贝,遵循母系遗传,有效种群大小为核 DNA 两性遗传方式的 1/4,故较少的样本即能反映群体遗传结构;进化速度快,为核 DNA 的 5~10 倍,因而增大了种群间与相近种间的遗传差异,使之易于检测。由于这些独特的优点,在鱼类种质鉴定中得到广泛的应用(肖武汉等,2000),从已有的文献报道看,应用线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因及 D-loop 区序列的测定和分析比较多。

建立我国水产种质的检测技术,用于种质保存、新品种培育、种质监测和种苗质量纠纷处理,是对我国现有水产原种、良种种质检测办法的重要补充,将有利于我国《水产苗种管理办法》顺利实施。《水产苗种管理办法》实施后,苗种的质量管理进一步加强,在苗种执法及质量纠纷处理过程中,种质检测技术可以有效判定苗种的质量状况,对保护良种培育者的知识产权,保护农民和消费者的利益,促进我国水产苗种市场的健康发展将起到积极作用。

水产养殖品种众多,分布的水域很广,具有非常丰富的多样性,是一笔宝贵的资源财富。我国虽在水产种质资源基础研究方面做了很多工作,但对水生物种群遗传结构和生物多样性等方面的研究仍十分欠缺,绝大多数养殖品种的遗传背景并不清楚,影响了水产种质资源的研究、保护和合理利用。需加大力量开展主要养殖品种的遗传背景研究,查清它们的遗传背景,建立新的种质标准。同时在物种多样性、生态系统多样性和种群内遗传多样性三个层次上研究我国水产养殖品种及其野生近缘种多样性的地理分布及生态学基础。研究主要养殖品种重要性状的遗传多样性的种群遗传结构。为养殖新品种开发、育种效果估测、杂种优势预测提供科学的依据和指导性意见。

(白俊杰)

第二节 鱼类品种的鉴定方法

优良品种是养殖业持续发展的基础,鱼类的品种鉴定技术在良种保纯、新品种保护工作以及鱼类遗传选育研究中具有重要作用。生产中误用了混杂不纯的品种必

定会导致鱼类生产、育种、销售、观赏等方面的经济和实用价值的损失。鱼类的品种鉴定包括形态学、细胞遗传学和 DNA 的多态性等多个方法,鉴定方法的选择在某种程度上依赖于所需鉴定工作的具体需求。20 世纪 70 年代以前,形态学鉴定是主要的检测方法,在品种鉴定和纯度分析上起到很重要的作用,该方法简便、经济,但许多形态学性状鉴定周期长、受环境影响大。随着电泳技术的发展,同工酶电泳技术被用于品种鉴定,同工酶电泳技术比较简单,能将部分的品种区分开,其稳定性、重复性好,具有较好的适用性。但同工酶是基因表达的直接产物,具有组织特异性、可利用数量少、多态性低、对酶的提取要求高等缺点,因而在杂种鉴别和亲缘关系较近的自交系区分上常因同工酶选择不当而得不到应有的结果。80 年代以来, DNA 分子标记技术的出现和发展为鱼类的品种鉴定提供了新的方法和手段。从分子遗传学水平上进行品种的鉴定可以弥补和克服形态学鉴定及同工酶、蛋白电泳鉴定中的许多缺陷和难题。目前开发出了 AFLP、RAPD、RFLP、SSR、线粒体 DNA 和核糖体 DNA 序列分析等鉴定方法,这些技术方法广泛应用于鱼类种质鉴定研究中。

一、形态学标记

最早的品种鉴定以形态学为基础。其特点是以鱼类的外部形态特征为依据,如:体色、体长、体宽、体质量、吻长和头长等。这种标记方法简单、直观、无需特别的工具,是目前生产上使用最广泛的方法之一。为了使形态特征的描述具有可比性,前人以不同材料分析了品种的形态差异,提出了形态学判别公式。如李思发等(1998)分析了尼罗罗非鱼品系间的形态差异,发现尼罗罗非鱼品系间的形态差异属于种内变异,须有多项参数综合判别才能判定,提出了综合判别率。李家乐等(1999)对台湾红罗非鱼后代不同体色的形态差异进行研究,为体色遗传规律提供了依据。形态学方法在很多鱼类品种鉴定上非常有效,赵建等(2007)运用传统生物学和框架分析法,对珠江 4 个水系卷口鱼的形态变异进行了分析,发现有三个江段的形态差异明显,有一定程度的分化,其判别分析构建的判别公式可以区分这三个江段四个群体的卷口鱼,判断正确率达到 99.2%。但不同江段卷口鱼的差异表现在整个鱼体上,而不能用单独的一两个参数进行鉴别。

由于外部形态易受环境等因素影响,不如某些器官内部结构的形态特征稳定性好,从而引用了形态解剖学鉴定技术。形态解剖学借助光学显微镜可以观察到肉眼不易分辨的诸如:血细胞的大小、头肾免疫细胞超微结构、消化器官组织结构等。葛慕湘等(2006)采用尾椎采血压制血涂片,对血细胞形态进行观察比较的方法对 5 种鱼进行了血细胞形态研究,结果发现:在红细胞大小比较上由大到小依次为:

草鱼、鲤鱼、梭鱼、乌鳢、牙鲆；在红细胞形态比较上，牙鲆红细胞最为狭长，梭鱼最圆，乌鳢的红细胞核最为细长；在白细胞形态大小比较上，生活在不同水域的鱼其各自细胞形态有所不同，牙鲆的淋巴细胞及单核细胞最小，草鱼最大，鲤鱼的血栓细胞最小。在红细胞和白细胞比上由大到小依次为：草鱼、鲤鱼、乌鳢。陆开宏等（2005）对两种摄藻鱼消化器官组织的形态进行比较研究，结果发现罗非鱼比鲢具有更大的肠内表面积和更薄的肌层厚度，具有更适合摄食蓝藻的腮耙结构。

当物种的品种数量少、形态差异明显时，形态学方法简单、直观。因此长期以来鱼类品种资源鉴定和育种材料的选择通常都采用这种方法。但是形态学的指标数量少，遗传表达不太稳定，易受环境和基因显隐性的影响，其表型变异并不能完全真实地反应遗传变异。同一基因型在不同的环境条件下可发育出不同的形态或生理特征，而相同的形态又可能涉及不同的基因型。同时因为观测、描述等方面的人为偏差，使形态学标记鉴定技术难以适用于现在复杂的杂交品种以及亲缘关系较近的品种鉴定。

二、细胞遗传学标记

细胞遗传学为鱼类鉴定和遗传结构的分析提供了另一类方法，它是从 20 世纪 30 年代起兴起的一种利用核型分析不同种的现代技术，计算出不同物种不同带型的频率进行鱼类分类的方法。随着分带、细胞原位杂交等新技术的应用，从染色体水平上揭示了更多的遗传多样性。使得该技术在鱼类遗传多样性研究及品种鉴定技术中成为有效方法之一。管瑞光（1980）对取自不同湖区银白鱼（*Aabarilius alburnops*）的染色体核型进行研究，发现取自白滇池和杞麓湖的银白鱼染色体核型存在明显差异。王德祥等（2006）对闽粤东族和岱衢族大黄鱼染色体核型进行了比较研究，发现岱衢族大黄鱼与闽粤东族大黄鱼染色体存在显著差别。细胞遗传学方法作为品种鉴定的方法具有较高灵敏性，但由于染色体制片技术和分辨率的限制，核型分析应用于品种鉴定还有一定的局限性，对于差异较小的鱼类品种，核型分析还不足以达到进行品种鉴定的要求。另外，该方法操作较复杂，不适合推广。

三、蛋白质电泳技术

蛋白质作为基因的表达产物，能反应物种 DNA 水平的差异。作为品种鉴定的蛋白质首先要在品种间有丰富的多样性且易于检测出来。梁前进等（1994）对野生鲫鱼和 5 个金鱼代表品种的肌肉蛋白进行了电泳分析，结果从电泳图谱上可以看出，野生鲫鱼首先演化为金鲫，再演化为草金鱼，通过金鲫和草金鱼后发展为文种鱼，最后演化成龙种鱼（如红龙睛）和蛋种鱼（如红头蛋鱼）两个关系很近的类

型。马德伟等（1995）利用辣椒种子的醇溶蛋白，用不连续垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳，对国内外 3 个主要栽培种的 30 个品种（品系）研究时发现，辣椒种子的醇溶蛋白谱带有 24~27 条，其中分子量居中的中部区带色深，带纹清晰，特异性强，是鉴别的主要区域，并成功地区分了甜柿椒类、长辣椒类和簇生椒类三个变种。一般认为，目前采用的高效液相色谱法对品种蛋白的水溶性蛋白进行色谱分离，根据不同品种由大小不同的主要色谱峰组成的指纹图谱，可以将各个品种区别开。

四、同工酶电泳技术

同工酶谱带差异主要是由决定酶蛋白的等位基因和非等位基因的差异造成的。绝大多数的同工酶座位是共显性的，等位基因及基因频率可直接计算，每个种群或亲缘种间可以分析相同的同工酶座位，遗传变异的水平和分布的数值可以直接相互比较。因其具有较丰富的变异类型，可作为种的指纹图谱，应用于鱼类的品种鉴定。尹绍武等（2007）对点带石斑鱼与褐点石斑鱼 7 种组织中的 4 种同工酶（EST、LDH、MDH、SOD）的组织特异性进行比较研究，结果表明：2 种石斑鱼的 4 种同工酶均具有明显的组织特异性，EST、SOD 酶谱间存在不同程度的种间差异，可作为鉴定点带石斑鱼与褐点石斑鱼的遗传标记。肖调义等（2004）对 4 种黄颡鱼乳酸脱氢酶进行了同工酶电泳研究，结果发现，在 4 种黄颡鱼中，光泽黄颡鱼血液、肌肉和肝脏中 LDH 酶谱型和迁移率与另外 3 种黄颡鱼都有着明显的差异，只有光泽黄颡鱼的肝脏组织显现出特异的 c 带，可作为鉴定光泽黄颡鱼的遗传标记。目前，对罗非鱼、文昌鱼、大黄鱼、鲤鱼、大银鱼和草鱼等种类的品种分类及鉴定中都开展了同工酶研究，取得了较好的结果（王宏伟，2003）。

同工酶种质鉴定技术相对于形态学标记有了很大进步，但是同工酶分析也有其内在的局限性。首先，同工酶是基因的表达产物，而非基因本身，其结果常受环境及发育状况的影响；其次，同工酶所能分析的位点是有限的，它只能分析那些编码可溶性酶的基因，而且还要求其产物易于提取并能通过凝胶电泳进行检测；同时它只能检测出可导致蛋白产物的氨基酸组成发生变化的基因的核苷酸突变，检测的范围只限于那些导致产物分子净电荷改变的氨基酸组成差异。根据有限位点所得出的遗传多样性，并不能代表整体基因组的实际情况。

五、分子标记技术

自 20 世纪 80 年代以来，随着分子生物学技术的发展，产生了一类重要的遗传标记——DNA 分子标记技术，即以直接检测 DNA 分子碱基序列变异为基础的分

标记。通过直接分析遗传物质的多态性来诊断生物内在基因的排布规律及其外在性状的表现规律,比较基因组 DNA 电泳图谱,通过鉴定 DNA 水平上的差异来鉴别品种。DNA 分子标记技术为品种纯度和真实性鉴定提供了准确、可靠、快速、方便的方法。利用 DNA 分子标记技术进行品种鉴定有以下特点:①DNA 分子标记数量大,多态性水平高,可鉴定表型难以鉴别的品种;②DNA 分子标记不受环境因素的影响,可在生长发育的任何阶段取材鉴定;③分离出的样品 DNA 可长期保存,这对于进行追溯性或仲裁性鉴定非常有利,因此它是品种鉴定的理想方法。常用 DNA 分子标记技术大致可分成两大类:一类是通过限制性酶切割结合分子杂交技术获得的标记,如 RFLP 标记 (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片断长度多态性);另一类是通过 PCR 扩增获得标记的技术,例如 RAPD 标记、SSR 标记和 AFLP 标记等,迄今已有 20 多种分子标记技术相继出现。

1. RFLP 标记技术

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性)是较早发明的分子标记技术,常利用放射性同位素标记探针,与经限制性内切酶消化的总基因组 DNA 杂交,不同品种的 DNA 产生的限制酶切片段的数目和大小不同,故通过杂交分析便能区别不同品种。由于同一物种不同品种间能找到很多 RFLP 标记,利用某品种特定的 RFLP 标记可以准确地标记该品种,该标记具有多态性稳定、重复性好、准确性高和共显性等特点,是较早应用于品种鉴定的分子标记。当同一种限制性内切酶酶解不同品种或同一品种的不同个体时,由于目标 DNA 既有同源性又有变异,酶切片段长度就有差异,不同材料显示的杂交带位置也有差异,这种差异就是限制性长度多态性 (方宣钧等, 2000)。动物线粒体 DNA (mtDNA) 是一种封闭循环式分子,长度为 14 000 ~ 26 000 bp 之间,比核 DNA 小得多,为同质型,具有母系遗传特性,其进化速度比核基因组快 5 ~ 10 倍。通常一个个体只含有一种类型的 mtDNA。RFLP 比较适合于分析此类分子量较小的 DNA。在鱼类种质的研究中,目前多是检测 mtDNA 多态性,该方法在种群间、近缘种间的差异、物种分类、系统发生的研究方面更有效,如解决了传统方法分类白鲑亚科鱼类难的问题和系统发生关系,以及蛋白质电泳很难分清养殖与野生大西洋鲑的种群鉴定 (Bematchez, et al, 1999)。RFLP 用于白鱼 (*Salangichthys microdon*)、比目鱼 (*Hippoglossus hippoglossus*)、鳕鱼 (*Gadus macrocephalus*)、带鱼 (*Regalecus glesne*) 等鱼类的品种鉴定也已见报道。

虽然 RFLP 有很多优点,但其所分析的 mtDNA 属于核外遗传物质,不能反映父本的种质信息,反映有效种群大小仅为核 DNA 的 1/4,易发生遗传漂变,祖先的遗传信息更易在后代中丢失,因此 RFLP 在遗传变异研究中存在很大的局限性。且该方法 DNA 用量大,耗费成本较高,操作繁琐,技术复杂,RFLP 的多态性变异程度

低, 其检测水平多依赖于内切酶的种类和数目, 且检测中需要的放射性同位素对人体有害, 虽然现在已有一些非放射性同位素标记方法问世, 但它们的高价格和繁琐的实验操作步骤影响了推广。

2. RAPD 标记技术

RAPD 标记技术是 1990 年 Williams 和 Welsh 发明的一种简便的分子标记技术, RAPD 分析以一系列随机排列的寡聚核苷酸为引物, 以所研究基因组 DNA 为模板进行的 PCR 扩增, 它能检测出大量的 DNA 遗传变异。扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色或银染来检测扩增产物 DNA 片段的多态性。这些扩增产物反应了基因组相应区域的 DNA 多态性。RAPD 分析所用的一系列引物的碱基序列不同, 但对于任一特定引物, 它与所检测的 DNA 序列有特定的结合座位, 虽然对于每个引物而言, 其检测基因 DNA 多态性是有限的, 但可用的引物数很多, 可检测区域几乎覆盖整个基因组, 所以理论上讲, RAPD 可对整个基因组进行多态性检测。其相对于 RFLP 来说, 比较简单, DNA 用量较少 (10 ~ 30 ng), 容易掌握, 检测灵敏、方便, 无需专门设计引物, 随机设计的长度为 9 ~ 10 个碱基的脱氧核糖核苷酸序列均可运用, 且引物不受种属限制。因此在品种鉴定和纯度分析上得到广泛应用。

在植物品种鉴定方面, 已用于玉米、水稻、小麦、大豆、棉花、油菜、芹菜等作物品种上。Hu 等 (1991) 发现利用 2 ~ 3 个引物即可有效鉴别出 14 个青花菜和 12 个花椰菜品种。陈洪等 (1996) 在国内首次报道了运用 RAPD 技术鉴定杂交水稻汕优 63 的纯度, 鉴定结果与成熟期的表现完全一致。张文兰 (2001) 利用 RAPD 技术, 进行了玉米、小麦、大豆等作物品种的纯度分析, 经与田间符合度鉴定, 符合率达 95% 以上。郭景伦 (1999) 利用 RAPD 分析研究了 10 个玉米自交系, 结果仅用一个引物, 可全部区分 10 个玉米自交系, 特别是亲缘关系较近的 478、488 和 3189 系, 用蛋白质和同工酶电泳方法根本无法区别, 而用 RAPD 分子标记方法鉴别, 差异就非常明显。余四斌等 (1996) 利用 RAPD 对水稻种子纯度进行探讨, 将 RAPD 分析结果与田间试验对比, 发现二者是一致的。

在鱼类方面, 赵文学等 (2006) 从 20 个随机引物中筛选到 S1、S2、S5、S7、S8 和 S17 6 个引物可以用来准确鉴别普通黄颡鱼、叉尾黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼和光泽黄颡鱼。吕耀平等 (2008) 利用 RAPD 分子标记技术对浙江瓯江溪水性鱼类唇鲮和花鲮进行种质鉴定分析, 筛选得到随机引物 S383、S399、S463 和 S471 扩增的 6 个特异性标记带, 可区分唇鲮和花鲮两种鱼。等朱必凤 (2006) 等利用 33 个随机引物研究了光倒刺鲃 (*Spinibarbus hollandi* Oshima)、中华倒刺鲃 (*S. sinensis* Bleeker) 和倒刺鲃 (*S. denticulatus denticulatus* Oshima) 基因组 DNA 多态性和种质分子标