

# 不同地理区域蛤蚧的 RAPD 分析

秦新民 梁燕妮 黄夕洋 庞广福

(广西师范大学生命科学学院 桂林 541004)

**摘要:**应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术,对 6 个不同地域(河池、南宁、桂林、百色、越南、泰国)的蛤蚧 (*Gekko gecko*) 进行了遗传多样性和系统发育分析。21 个 RAPD 引物共扩增了 218 个位点,片段大小在 200~2 000 bp,其中 184 个是多态位点,占 84.4%。地域之间的遗传距离指数在 0.011 2~0.963 1,遗传相似性系数在 0.381 7~0.988 8 之间。根据遗传距离指数和遗传相似性系数,用 NTSYSpc 2.10 软件包中的 UPGMA 法构建了系统聚类图,结果均显示南宁地区、桂林地区、百色地区和河池地区先聚在一起,再和越南聚在一起,最后和泰国群体聚类。这与形态地理分布特征相一致。

**关键词:**蛤蚧 随机扩增多态 DNA 遗传相似性 遗传距离

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)06-14-05

## RAPD Analysis on Genetic Divergence and Phylogenesis of *Gekko gecko* from Different Areas

QIN Xin-Min LIANG Yan-Ni HUANG Xi-Yang PANG Guang-Fu

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

**Abstract:** Genetic divergence and phylogenesis of *Gekko gecko* from six different areas (Hechi, Nanning, Guilin, Baise, Viet Nam, Thailand) were analyzed by Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) method. A total of 218 bands were obtained from 21 effective primers, of which 184 bands were polymorphic, accounting for 84.4%. Relative genetic distance of *G. gecko* from six areas was 0.0112–0.9631, and similarity coefficient was 0.3817–0.9888. Based on genetic distance and genetic similarity, molecular phylogenetic tree of *G. gecko* has been constructed by using UPGMA method. The results from the two methods are similar in general.

**Key words:** *Gekko gecko*; Random Amplified Polymorphic DNAs; Genetic similarity; Genetic distance

蛤蚧 (*Gekko gecko*) 属于脊椎动物亚门 (Vertebrata) 爬行纲 (Reptilia) 有鳞目 (Squamata) 蜥蜴亚目 (Lacertilia) 壁虎科 (Gekkonidae), 主要分布区域是北回归线附近的亚热带石灰岩地区。据文献报道, 国外主要分布于印度、缅甸、泰国、越南、马来西亚、印度尼西亚等东南亚诸国。我国仅见于广西、广东、海南、福建、云南和台湾等省区的石山中, 其中, 广西是蛤蚧分布最广的地区, 全省 8 个地区内, 全部都有蛤蚧分布<sup>[1]</sup>。近年来由于生态环境的破坏, 人为的捕杀, 蛤蚧生存和繁殖条件不断恶化, 分布地域逐渐缩小。现已列为我国二级保

护动物, 广西省一级保护动物。

对蛤蚧的研究工作已有不少报道, 如蛤蚧的分布、生态习性、生理、食性、繁殖、人工饲养方法等<sup>[2~9]</sup>, 但在分子系统学方面的研究尚少<sup>[10~12]</sup>, 其 RAPD 研究亦尚未见报道。近年来 RAPD 技术广泛应用于近缘种、亚种及品种间, 以及种群间的亲缘关系和进化的研究<sup>[13~16]</sup>, 本

基金项目 广西博士学位授权学位点学科建设资助项目;  
第一作者介绍 秦新民, 男, 博士, 教授; 研究方向: 分子生物学; E-mail: qinlaoshi8162@sina.com。

收稿日期: 2005-04-05 修回日期: 2005-09-25

研究采用 RAPD 技术检测不同区域蛤蚧的遗传多样性,以期为了解蛤蚧的遗传背景提供资料。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 实验用蛤蚧分别产自广西的河池地区(都安)、南宁地区(扶绥)、桂林地区(平乐)、百色地区(凌云)、越南及泰国(表 1)。取其尾部肌肉,置 -70℃ 冰箱保存备用。

表 1 实验材料及其来源

Table 1 The localities of experiment material

采集地点 Location	采集时间 Time	数量 Sample size
广西河池都安县 Duan County, Hechi, Guangxi	2004.08	3
广西南宁扶绥县 Fushui County, Nanning, Guangxi	2004.08	5
广西桂林平乐县 Pingle County, Guilin, Guangxi	2004.08	2
广西百色凌云县 Lingyun County, Baise, Guangxi	2004.07	6
越南 Viet Nam	2004.06	5
泰国 Thailand	2004.09	6

越南品种购自于自由市场,泰国品种由广西梧州动植物酒厂提供。

Viet Nam species come from free market, Thailand species come from propagation wine factory of Wuzhou, Guangxi.

10 碱基随机引物共 100 个,购自上海生物工程技术有限公司。*Taq* DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。Marker 购自华美生物工程公司。

**1.2 基因组 DNA 的提取** 取 0.2 g 尾部肌肉,用眼科手术剪剪碎,加入 1 000  $\mu$ l 事先预热的 STNE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 1% SDS)混匀后加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K(浓度为 10 mg/L),55℃ 水浴过夜(约 12 h)。取出加入 300  $\mu$ l 饱和 NaCl,8 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液加入 RNase 至终浓度为 20  $\mu$ g/ml,37℃ 水浴 1 h。加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),12 000 r/min 离心 10 min。取上清液加入 2 倍体积的预冷无水乙醇和 1/10 体积的醋酸钠沉淀

DNA,冰浴 20 min,12 000 r/min 离心 10 min。再用 70% 酒精洗涤 2 次,无水乙醇洗 1 次,干燥,加入 50  $\mu$ l TE 溶解。置 -20℃ 冰箱备用。

**1.3 引物筛选** 用 S81-S140、S161-S180、S341-S360 共 100 个引物(上海生工产品)对 2 个样品进行扩增,每个引物均重复扩增一次,筛选出扩增产物电泳谱带稳定且重复性良好的 21 个引物(表 2)。用这 21 个引物对上述 6 个不同地域的蛤蚧分别做 RAPD 扩增。

表 2 随机引物序列及扩增结果

Table 2 Sequences of the stably amplified arbitrary primers

引物号 Primer	序列 5' - 3' Sequence	标记数 No. of loci	多态数 No. of polymorphic loci
S89	CTGACCTCAC	13	8
S91	TGCCCGTGGT	14	13
S92	CAGCTCAGGA	7	7
S97	ACGACCGACA	15	15
S101	GGTCCGAGAA	14	11
S104	GGAAGTCGCC	11	10
S108	GAAACACCCC	11	9
S111	CTTCCGCAGT	10	6
S112	ACGGCATGT	11	8
S127	CCGATATCGG	11	11
S128	GGGATATCGG	8	8
S165	TGTTCCACGG	9	8
S167	CATCGACAAG	10	8
S170	ACAACCGGAG	9	9
S171	ACATGCCGTC	9	7
S174	TGACGGCGGT	10	7
S344	CCGAACACGG	14	13
S351	ACTCTGCGGA	9	6
S352	GTCCCGCGGT	11	9
S353	CCACACTACC	5	4
S354	CACCCGGATG	7	7
总数 Total		218	184

**1.4 PCR 扩增** PCR 反应总体积为 25  $\mu$ l。混合物中含 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  buffer(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L KCl); 0.5  $\mu$ l 2.5 mmol/L dNTP, 2  $\mu$ l 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 0.25  $\mu$ l 50 mmol/L 引物; 0.5  $\mu$ l 基因组 DNA(约 40~200 ng); 1 U *Taq* DNA 聚合酶,加双蒸水 16.4  $\mu$ l。反应程序为 95℃ 预变性 1 min, 94℃ 变性 1 min, 36℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共进行 40 个循环,完成

最后一次循环后,72℃延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 1 × TAE,恒电压 100 V,电泳 1.5 h,EB 染色后检测多态性。用上海复日 FR-980 型紫外与可见光分析系统进行图像扫描与分析。

**1.5 数据处理与统计分析** RAPD 是显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,选择 200 ~ 2 000 bp 之间的可重复扩增条带作为有效带,按照相同迁移位置上有无扩增条带分别记为“1”和“0”。

根据得到的原始数据,计算多态位点百分率  $P = p/n \times 100$ 。其中  $p$  为多态位点的数目; $n$  为位点总数。运用 NTSYSpc 2.10\* 软件包对扩增结果进行系统分析。采用 Nei-Li<sup>[17]</sup>的公式  $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ,计算任意两个群体间的遗传相似性系数( $S$ ),式中  $N_x$  和  $N_y$  分别为  $x$  和  $y$  群体的随机扩增 DNA 片段数。遗传距离

指数( $D$ )按 Nei 的方法( $D = -\ln S$ ),采用非加权的组平均法(UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean)对遗传相似性系数( $S$ )矩阵进行聚类分析,构建聚类关系图。

## 2 结果

**2.1 RAPD 扩增结果** 本研究使用 21 个重复性好、扩增产物清晰的 10 bp 引物,对 6 个不同地域的蛤蚧进行了 RAPD 分析。共检测到 218 条扩增片段,其中有 184 条是多态片段,占总片段数的 84.4%。单个引物获得的标记数在 5 ~ 15 之间,平均每个引物获得的标记数为 10.38。如果只算中国和越南 5 个群体,共获 162 条扩增条带,多态片段只有 61 条,仅占总片段数的 37.6%。图 1 为引物 S111、S344 的扩增条带。从图中可以看出,泰国与其他地区相比有明显的多态性。

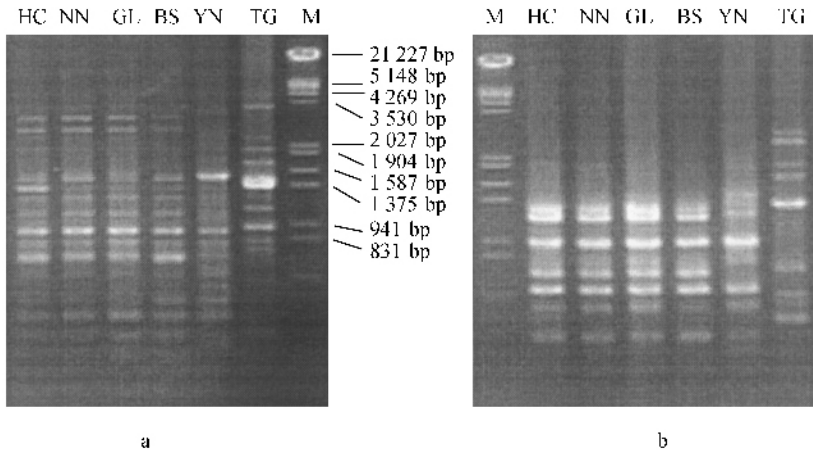


图 1 引物 S111(a)和 S344(b)扩增条带

Fig.1 RAPD bands obtained with primer S111(a)and S344(b)

M: Lambda DNA/EcoRI + Hin dIII Marker; HC: 河池地区; NN: 南宁地区; GL: 桂林地区; BS: 百色地区; YN: 越南; TG: 泰国。  
 M: Lambda DNA/EcoRI + Hin dIII Marker; HC: Hechi area; NN: Nanning area;  
 GL: Guilin area; BS: Baise area; YN: Viet Nam; TG: Thailand.

**2.2 遗传多样性分析** 通过计算遗传相似性系数( $S$ )和遗传距离指数( $D$ ) (表 3)可以看出,6 个不同地域间蛤蚧的遗传相似性系数( $S$ )的变化范围在 0.381 7 ~ 0.988 8,遗传距离指数( $D$ )的变化范围为 0.011 2 ~ 0.963 1。南宁地区与桂林地区间的遗传距离最小,为 0.011 2;

桂林与百色间的遗传距离为 0.015 2,说明它们之间的亲缘关系较近。泰国与另 5 个区域间的遗传距离都很远,且相似性系数仅在 0.381 7 ~

\* Rohlf F. J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York, USA.

0.409 8 之间,相似性较低,亲缘关系较远。

表 3 6 个区域蛤蚧遗传距离指数(上方)和遗传相似性系数(下方)矩阵

Table 3 Genetic distance index and Genetic similarity matrix between different populations of *Gekko gecko*

	HC	NN	GL	BS	YN	TG
HC		0.030 1	0.034 0	0.034 4	0.245 8	0.886 3
NN	0.970 4		0.011 2	0.026 6	0.226 8	0.927 1
GL	0.966 5	0.988 8		0.015 2	0.223 1	0.902 8
BS	0.966 0	0.973 6	0.984 8		0.246 4	0.929 3
YN	0.782 0	0.797 0	0.800 0	0.781 6		0.963 1
TG	0.409 8	0.393 4	0.403 3	0.393 3	0.381 7	

HC 河池地区; NN 南宁地区; GL 桂林地区; BS 百色地区; YN 越南; TG 泰国。

HC :Hechi area ; NN :Nanning area ; GL : Guilin area ; BS : Baise area ; YN :Viet Nam ; TG :Thailand.

2.3 聚类分析 根据遗传相似性系数(S)矩阵,运用 NTSYSpc 2.10 软件包进行 UPMGA 聚类分析,得到亲缘关系系统树(图 2)。从 6 个不同地域蛤蚧 RAPD 扩增标记相似性系数(S)的聚类关系图看,南宁地区、桂林地区、百色地区和河池地区可视为亲缘关系较近的类群。它们汇聚一起后再与越南群体聚类,最后与泰国群体聚类。

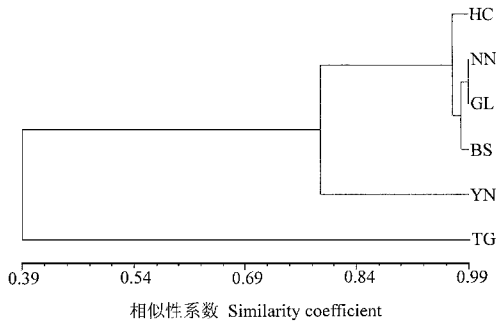


图 2 基于相似性系数构建的 UPGMA 聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram based on Nei & Li similarity coefficient

HC 河池地区; NN 南宁地区; GL 桂林地区; BS 百色地区; YN 越南; TG 泰国。

HC :Hechi area ; NN :Nanning area ; GL : Guilin area ; BS :Baise area ; YN :Viet Nam ; TG :Thailand.

### 3 讨论

#### 3.1 蛤蚧的遗传变异与形态变异的关系 对

于 6 个不同区域蛤蚧的核 DNA,从总的多态位点百分率来看,蛤蚧的遗传变异比较丰富,达 84.4%,但如果不计泰国群体,其遗传变异就非常的低,仅为 37.6%。由系统树可以看出南宁、桂林、百色和河池地区这 4 个群体的遗传相似性很高,并先聚在一起,而泰国群体的遗传距离很远。从地理分布上说,南宁、桂林、百色和河池地区这 4 个地区相隔较近,环境条件相差不大。而越南又与南宁、百色接壤。泰国在地理位置上则相对相隔较远,环境条件相差较大,从而造成较大差异。从形态上说,传统分类认为蛤蚧可分为黑蛤蚧和红蛤蚧,且这两种蛤蚧地理分布的区域性很明显<sup>[18]</sup>。黑蛤蚧主要分布在中国的广西和云南的南部及越南与中国接壤的北部地区。红蛤蚧分布在泰国,越南的河内、海防及其以南的地区等地,又称泰国蛤蚧。从聚类图可以看到泰国群体与其他 5 个地域群体的亲缘性较远,这与上述地理分布基本一致,至于他们之间的变异是否达到了亚种或种一级的水平,笔者认为还有待更进一步的研究和探讨。

3.2 蛤蚧的保护 广西是蛤蚧的主产区,从研究结果看,如果只算中国广西和越南 5 个群体,其遗传多态位点百分率仅有 37.6%,遗传变异非常小。由于蛤蚧对生活环境的的要求很高,且人类活动对其生活环境的不断破坏,使得蛤蚧越来越隔离于较小的范围,导致近交繁殖。而人类的滥捕滥杀使其数量急剧下降,从而导致了瓶颈效应。

蛤蚧为我国二级保护动物,由于具有很高的药用价值,生产上需求量大,长期以来大量的人为捕捉及人为造成的自然环境的急剧恶化,给蛤蚧的生存带来了巨大的威胁。为保护好蛤蚧资源,保持自然生态系统的多样性,应采取积极有效的方法,如在蛤蚧活动频繁区域,制定相关的保护条例,减少人为破坏程度,大力发展人工养殖,保护野生蛤蚧资源。从而使蛤蚧资源既能得到很好的保护,又能确保其资源能合理地得到利用。

致谢 本实验得到了唐绍清博士的细心指导，在此表示衷心感谢！

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 唐振杰,李汉华,陈旻等.广西蛤蚧的分布及生态调查. *广西科学*,1997, **4**(4):259~263.
- [ 2 ] 李汉华,唐振杰,庾太林等.广西大壁虎及资源保护. *广西师范大学学报*,1996, **14**(2):62~66.
- [ 3 ] 于金贤,吴赵佛.蛤蚧产卵观察. *动物学杂志*,1986, **21**(6):25~26.
- [ 4 ] 杨大同.我国南部的一种经济爬行动物——蛤蚧. *动物学杂志*,1981, **16**(4):36~37.
- [ 5 ] 李桂芬,蒙绍权,姜世英.蛤蚧前背侧室峭嘴外侧区的纤维联系. *动物学研究*,2001, **22**(1):74~77.
- [ 6 ] 陈旻,唐振杰,李汉华.蛤蚧卵巢结构和卵泡发育的研究. *广西师范大学学报(自然科学版)*,1996, **14**(1):71~75.
- [ 7 ] 蓝成书,李东风,杨立川.蛤蚧发声器结构及语图的初步分析. *动物学杂志*,1991, **26**(6):33~34.
- [ 8 ] 王学斌,阎凡信,刘明河.脊椎动物发声器及其控制中枢. *动物学杂志*,1999, **34**(3):56~59.
- [ 9 ] 陈鲲,王炫燊.蛤蚧 ADVR 视区结构. *广西师范大学学报(自然科学版)*,1997, **15**(1):72~76.
- [ 10 ] 杜世章,陈立侨,刘定震.中国壁虎属 *Gekko* 动物系统学研究进展. *四川动物*,2002, **21**(3):200~204.
- [ 11 ] 韩德民,周开亚,王义权.从 12S rRNA 基因序列探讨中国 10 种壁虎的系统关系. *动物学报*,2001, **47**(2):139~144.
- [ 12 ] 刘忠权,王义权,周开亚等.大壁虎线粒体 12S rRNA 基因片段的两种单倍型. *安徽师范大学学报(自然科学版)*,2000, **23**(4):339~340.
- [ 13 ] 林茂,黄景,李正等.大鲵野生亲代与人工繁殖二代的随机扩增多态 DNA 分析. *上海水产大学学报*,2003, **12**:20~23.
- [ 14 ] 白素英,徐艳春,周冬良等.中国豹猫 6 个群体的 RAPD 分析. *东北林业大学学报*,2004, **32**(3):52~54.
- [ 15 ] 潘宝平,杨毅.利用 RAPD 标记研究几种淡水腹足类的亲源关系. *动物学杂志*,2003, **38**(3):7~13.
- [ 16 ] 曹天文,张敏,张建珍等.大紫蛱蝶三个地理种群的 RAPD 遗传多样性分析. *动物分类学报*,2005, **30**(1):1~9.
- [ 17 ] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the Natural Academy of Science*,1979, **76**:5269~5273.
- [ 18 ] 张青青,唐业忠,黄永成等.蛤蚧地理变异的初步研究. *动物学杂志*,1997, **32**(5):44~46.