

长石爬鮡 3 个地理群体遗传多样性的 RAPD 分析

杨丽萍^{1,2}, 周 伟²

(1. 西南林业大学林学院, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224;

2. 河南师范大学水产学院, 新乡 453007)

摘要: 采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对李仙江流域景东、国庆和大寨长石爬鮡 (*Euchiloglanis longus*) 种群的遗传多样性进行了分析。从 100 条 RAPD 随机引物中筛选出 20 条引物, 对长石爬鮡 3 个地理种群进行了分析; 共检测到 58 个有效位点, 其中多态位点 36 个, 多态位点达 62.07%, Nei 基因多样性指数为 0.2378, Shannon 信息指数为 0.3501。3 个群体未检测到各自特有的扩增带。AMOVA 分析结果显示, 大多数 (73.06%) 的遗传变异由群体内不同个体间的遗传差异造成, 26.94% 的遗传变异来自于群体间。种群间的遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.2104, 基因流 N_m 为 1.8762。根据个体间遗传距离进行的 PCoA 分析显示, 3 个群体基本分开。

关键词: 长石爬鮡; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: Q343 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2013)02-0085-05

石爬鮡属 (*Euchiloglanis*) 隶属于鲶形目 (Siluriformes)、鮡科 (Sisoridae), 多生活在江河或山涧多砾石的急流河滩处, 属底栖中小型淡水鱼类, 在中国局限分布在金沙江和岷江水系 (周伟和李明会, 2006)。该属鱼类游泳能力弱, 对水文特征和水质变化极为敏感, 可作为模型动物间接反应环境及气候变化对水生动物资源的影响。近年来的调查显示, 红河水系也有分布, 且为该属中的新种, 被命名为长石爬鮡 (*Euchiloglanis longus*) (Zhou et al, 2011)。石爬鮡属鱼类的肉嫩味美、高蛋白质、低脂肪, 为重要的野生经济物种, 市场价值较高 (潘艳云等, 2009; 唐文家和李柯懋, 2011)。2010 年以来, 由于云南地区的连续干旱及酷鱼滥捕、水库修建、水电站建设, 长石爬鮡种群数量及分布区域急剧减少。因此, 对其开展种质资源研究十分必要。迄今, 有关石爬鮡属鱼类的研究主要集中于系统发育分析、分类、地理分布、繁殖生物学、血液学指标、血细胞分类、肌肉营养和系统发育等方面 (黄寄夔和杜军, 2003; 郭宪光等, 2004; 周伟等, 2005; 潘艳云等, 2009; 唐文家和李柯懋, 2011)。用分子标记技术检测石爬鮡属鱼类遗传多样性水平变化, 评估其资源

状况的研究尚未见报道。

随机扩增多态 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术具有相对简单、易于操作、省时省力、无需专门设计引物、产物遗传多样性丰富等优点, 是极为方便有效的 DNA 遗传标记系统之一, 该技术已广泛应用于物种遗传多样性、群体遗传、亲缘关系鉴定、特定基因的标记和定位等许多研究领域 (郑伟等, 2007; 王广银等, 2011; 曾珍等, 2012; 刘宏毅等, 2012)。本研究应用 RAPD 技术对分别采自景东磨腊、江城国庆和江城大寨的长石爬鮡群体进行遗传多样性和差异性分析, 旨在获得李仙江流域长石爬鮡不同地理群体的遗传多样性、遗传结构和遗传变异程度, 为该物种的种质资源保护和合理利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

长石爬鮡样品分别采自景东磨腊、江城国庆和江城大寨, 3 个群体共 36 个样品。样品采集相关信息见图 1 和表 1。获得标本后, 采用 95% 酒精浸泡, 运回实验室后放入 -20°C 冰柜备用。

1.2 试验方法

取出冰冻保存的长石爬鮡样品, 剪取约 50 mg 肌肉组织, 采用常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, Eppendorf 分光光度计测定 DNA 纯度与浓度。

RAPD 方法参照 Williams 等 (1990) 的反应条件并稍作改动。PCR 反应总体积为 20 μL , 其中 10

收稿日期: 2012-07-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31160419); 云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金 (ZK10A306); 西南林业大学动物学重点学科项目 (XKX200903)。

通讯作者: 周伟。E-mail: weizhouyn@163.com

作者简介: 杨丽萍, 1980 年生, 女, 博士, 副教授, 主要从事鱼类资源保护与利用。E-mail: lpyangswfu@163.com

× PCR 缓冲液 2.0 μL, MgCl₂ 3.0 mmol/L, dNTP 0.1 mmol/L, 引物 0.2 mol/L, TaqDNA 聚合酶 1.0 U, 模板 DNA 约 20 ng。为防止水分蒸发, 加入 10 μL 石蜡油。反应在 Bio-Rad 扩增仪上进行, 循环参数为 94℃ 预变性 7 min, 后接 45 个循环, 每循环为 94℃ 变性 1 min, 37℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min; 72℃ 延伸 10 min。反应产物在 4℃ 下保存。1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 经溴化乙锭染色后, 凝胶成像, 获得电泳图后进行后续分析。

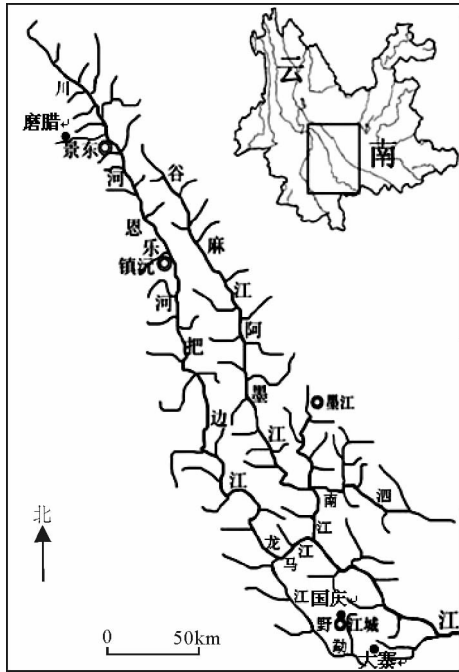


图 1 李仙江流域长石爬鮡采样点

Fig. 1 Sampling sites of *Euschiloglanis longus*

表 1 长石爬鮡的采集信息

Tab. 1 Collected information of *Euschiloglanis longus*

采集时间	采集地点	群体编号	样品数/个
2003-11-01	景东磨腊	JD	12
2004-12-08	江城国庆	GQ	12
2012-01-20	江城大寨	DZ	12

1.3 数据分析

电泳图谱中的每条 DNA 谱带记为 1 个位点, 只记录电泳后可辨认的条带。当某一扩增带出现时记为 1, 缺失记为 0, 从而建立原始谱带矩阵。

采用软件 POPGENE 1.31 (Yeh et al, 1997) 分析长石爬鮡群体遗传多样性, 包括多态位点比例 (P)、平均杂合度 (H) 和 Shannon 多样性指数 (I) 等。具体计算公式如下:

$$P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%;$$

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

$$I = - \sum \pi_i \ln \pi_i / n;$$

式中: P_i 为第 i 个基因的频率, π_i 为某一条带在群体中出现的频率, \ln 为自然对数, n 为群体总的位点数。

用 GenALEx 6.41 (Peakall & Smouse, 2006) 对 RAPD 数据进行分子方差分析 (analysis of molecular variance; AMOVA), 分析遗传变异在种群内和种群间的分布, 计算群体间遗传分化系数, 并计算概率值, 用于分析差异显著性情况。通过 GenALEx 6.41 软件对个体间遗传距离进行主坐标分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA), 将个体间遗传距离可视化。

2 结果

2.1 RAPD 引物筛选

从 3 个群体中各选 1 份 DNA 样本, 制成 DNA 混合模板, 对上海生工合成的 100 条随机引物 (S161 ~ S180, S441 ~ S500, S1021 ~ S1040) 进行筛选; 最后以扩增条带清晰、重复性好、稳定性好、扩增条带数较多为选择标准, 共选择 20 条引物用于本研究 (表 2)。对选定引物扩增后的电泳图进行统计分析, 发现 20 条引物检测到的位点数在 2 ~ 6, 选取大小在 200 ~ 2 000 bp 的电泳条带进行统计。

表 2 研究所用 RAPD 引物

Tab. 2 Primers for RAPD analysis

引物	引物序列 5'→3'	引物	引物序列 5'→3'
S163	CAGAAGCCCA	S473	GGAGTGCCTC
S173	CTGGGGCTGA	S475	GGAAGCCAAC
S452	CAGTGTGTG	S476	CCAAGCTGCC
S454	AGCATGGCTC	S477	TGACCCGCCT
S455	TGGCGTCTT	S490	TGTGCCGAA
S459	GGTGCACGTT	S494	GGACGCTTCA
S461	GTAGCACTCC	S496	AGTGCAGCCA
S463	CTGATACGCC	S1023	GGGTCCAAAG
S466	GTGGGCTGAC	S1026	TGCCGCACTT
S471	AACCGCTCGG	S1039	TCGCTGCTGT

2.2 群体遗传多样性

20 条引物对 3 个群体 36 个个体进行扩增, 共扩增出条带 58 条, 即存在 58 个有效位点, 其中多态位点有 36 个, 占 62.07%。景东 (JD) 群体遗传多样性为 39.66%; 国庆 (GQ) 群体遗传多样性最高, 达到 51.72%; 大寨 (DZ) 群体为 39.66%。遗传多样性高低顺序为: 国庆 (GQ) > 景东 (JD) > 大寨 (DZ)。群体遗传多样性分析结果见表 3。图 2 列举了引物 S1023 对 3 个群体样品的扩增结果。

Nei's 基因多样性 (H) 与 Shannon 信息指数 (I) 均属于遗传多样性参数, 可指示群体遗传多样性的

高低。从表3可以看出,这2个参数的变化趋势一致,3个群体的遗传多样性由高到低,依次为:国庆(GQ) > 景东(JD) > 大寨(DZ)。

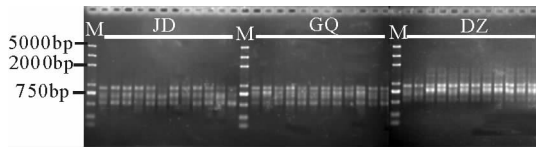


图2 引物 S1023 对长石爬鮡群体的扩增电泳图

Fig.2 Amplification electrophoretogram of RAPD-PCR product in *Euchiloglanis longus* using primer S1023

表3 长石爬鮡种群遗传多样性参数

Tab.3 Genetic diversity parameters within different *Euchiloglanis longus* populations

群体编号	<i>H</i>	<i>I</i>	多态位点	比例/%
景东(JD)	0.1692	0.2448	23	39.66
国庆(GQ)	0.2298	0.3281	30	51.72
大寨(DZ)	0.1641	0.2372	23	39.66
总计	0.2378	0.3501	36	62.07

2.3 群体间的遗传分化

假设群体处于 Hardy-Weinberg 平衡,根据 Nei' 的总基因多样性(*H_t*)和种群内的基因多样性(*H*)测得种群间的分化系数(*G_{st}*)为 0.2104,即总的变异 21.04% 存在于种群间。由 *G_{st}* 估算的种群间基因流 *N_m* 为 1.8762。分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)结果显示,总的遗传分化指数为 0.2694,26.94% 的变异存在于种群间,大部分变异为种群内变异(73.06%),概率值 *P* = 0.010,表示存在显著差异,尚未达到极显著水平。

2.4 遗传距离

基于 Nei's 无偏遗传距离,群间遗传距离范围为 0.0285 ~ 0.1358(表4);其中,景东与大寨群体遗传距离最大,达 0.1358,景东与国庆群体遗传距离最小,为 0.0285。国庆与景东群体的相似性高达 97.19%。大寨群体和国庆群体的相似性为 90.91%。

表4 群体间 NEI'S (1978) 无偏距离及相似性

Tab.4 NEI'S (1978) unbiased genetic distance and similarity among populations

群体编号	JD	GQ	DZ
JD		97.19%	87.30%
GQ	0.0285		90.91%
DZ	0.1358	0.0953	

对个体间的 Nei's 遗传距离进行主坐标分析(Principal Coordinate Analysis, PCoA),并构建散点图3。从图3可以看出,国庆部分个体与大寨、景东

的个别个体均存在一定的混合,而景东、大寨群体的个体所处位置相对集中。

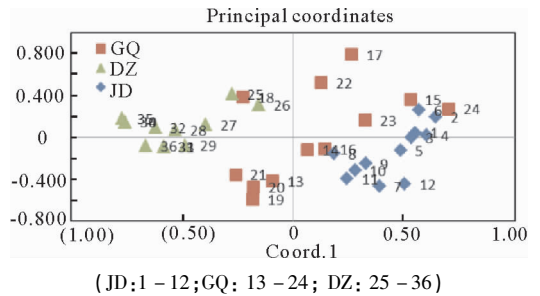


图3 基于长石爬鮡个体间遗传距离的主坐标分析(PCoA)散点图

Fig.3 Scatterplot of the principal coordinate's analysis (PCoA) for each individual of *Euchiloglanis longus*

3 讨论

3.1 长石爬鮡种群的遗传多样性

多态位点比例可以反映物种的遗传多样性情况。RAPD 方法检测到鲇形目几种鱼类的多态位点比例,怀头鲇(*Silurus soldatovi*)、鲇(*Silurus asotus*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvirdraco*)和乌苏里拟鲿(*Pseudobagrus ussuriensis*)群体介于 20.29% ~ 41.77% (李超,2008);西江斑鲮(*Mystus guttatus*)为 44.9% (焦宗垚等,2007);长吻鮠(*Leiocassis longirostris*)为 41.75% (莫艳秀等,2010);野生大鳍鲮(*Mystus macropterus*)高达 72.66% (周丽,2008),但各地理群体的多态位点比例在 23.74% ~ 39.57%;长江中上游 7 个江段的南方鲇(*Silurus meridionalis*)为 78.29%,而各地理群体则介于 28.75% ~ 48.62% (单红等,2007)。本研究测得长石爬鮡野生种群的多态位点比例为 62.07%,3 个地理群体的多态位点比例在 39.66% ~ 51.72%;与鲇形目其他鱼类相比,长石爬鮡物种水平多态位点比例虽然低于野生大鳍鲮和南方鲇,但高于怀头鲇、鲇、黄颡鱼、乌苏里拟鲿、西江斑鲮和长吻鮠,处于相对较高水平。在居群水平上,长石爬鮡与鲇形目其他群体接近,甚至偏高。

遗传多样性是指生物种内和种间的遗传变异性,是生物适应环境与进化的基础。依据群体遗传学理论,遗传多样性的降低或丧失,会导致生物对环境的适应能力减弱,这对于生活在多变环境中的野生群体构成极大威胁。掌握物种的遗传多样性信息,可为有效保持种内遗传多样性水平,维持物种进化潜力、可持续利用物种的种质资源提供重要依据。本研究中,长石爬鮡国庆、景东、大寨群体的遗传多

多样性参数均较高,显示其遗传多样性较为丰富,但长石爬鮡目前的境况不容乐观。长石爬鮡因味道鲜美,售价远高于其他野生鱼类,造成了当地渔民对其资源的掠夺性捕杀。长石爬鮡的生境非常有限,随着水利工程建设,其栖息地日渐萎缩。尽管现在长石爬鮡遗传多样性水平较高,但仍应该引起足够的重视。

3.2 长石爬鮡群体的遗传结构与遗传分化

本研究 Nei's 无偏遗传距离结果显示,景东与大寨长石爬鮡群体遗传距离最大,达 0.1358,景东与国庆的群体遗传距离最小,为 0.0285;而 3 个群体间的地理距离是景东与大寨相聚最远,国庆与大寨距离最近。景东与大寨群体遗传距离与地理距离相关,但景东与国庆遗传距离与地理距离联系不强。景东地区为李仙江支流——把边江的流经区域,而国庆为李仙江干流区域,推测造成此现象的原因可能同属一个流域。虽然大寨群体也属于李仙江流域,但当地的溪流在土卡河直接注入李仙江干流(国庆后面),这可能造成大寨与国庆群体虽然地理距离最近,但遗传距离不是最小的现象。

对个体间聚类结果进行主坐标分析(PCoA),从构建的散点图 3 可以看出,国庆与大寨、景东群体均存在一些混合,而景东、大寨群体所处位置相对集中。推测国庆可能是衔接大寨和景东的中间过渡群体。

本研究长石爬鮡群体间遗传距离在 0.0285 ~ 0.1358,这与 Thorpe(1982)认为同一物种的居群间遗传距离为 0.03 ~ 0.20、遗传相似度为 0.80 ~ 0.97 的观点一致;然而,群体的遗传分化系数(G_{st})达 0.2104,基于海岛模型(island model)和 Wright's 关于基因流的计算公式,本研究得到长石爬鮡群体间的基因流 Nm 为 1.8762。基因流是影响群体内部和群体之间遗传变异程度的重要因素。根据群体遗传学理论,忽略居群大小,如果基因流 $Nm < 1$,则由于遗传漂变导致种群间出现明显的遗传分化;当居群间的基因流 $Nm > 1$ 时,则能发挥均质化作用,即能有效抑制由遗传漂变而引起的遗传分化(Wright, 1931);本研究中长石爬鮡群体间居群间过去可能存在着一程度的基因交流,且遗传漂变不是影响居群分化的主要因素。

志谢:感谢西南林业大学动物学专业硕士研究生杨熙在 RAPD 实验过程中给予的帮助!

参考文献

- 单红,王庆,朱银安,等.2007.长江中上游南方鲃遗传多样性的 RAPD 分析[J].淡水渔业,37(6):56-60.
- 郭宪光,张耀光,何舜平.2004.中国石爬鮡属鱼类的形态变异及物种的有效性研究[J].水生生物学报,28(3):260-268.
- 黄奇鸾,杜军.2003.石爬鮡属鱼类的繁殖生物学初步研究[J].西昌农业高等专科学校学报,17(3):1-2.
- 焦宗焄,陈赛,朱新平,等.2007.野生斑鳊西江地理群的遗传多样性分析[J].农业生物技术学报,15(1):58-62.
- 李超.2008.4种鲃形目鱼类的 RAPD 研究[D].哈尔滨:东北林业大学.
- 刘宏毅,黎明星,肖俊.2012.叉尾斗鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J].大连海洋大学学报,27(2):158-161.
- 莫艳秀,王晓清,莫永亮.2010.长吻鮠遗传多样性的 RAPD 分析[J].南方水产,6(6):77-80.
- 潘艳云,冯健,杜卫萍,等.2009.石爬鮡含肉率及肌肉营养成分分析[J].水生生物学报,33(5):980-985.
- 唐文家,李柯懋.2011.黄石爬鮡生物学特性及保护建议[J].河北渔业,(6):19-21.
- 王广银,丁文勇,陈少波,等.2011.浙闽香鱼 4 个群体遗传多样性的 RAPD 分析[J].科技通报,27(6):863-868.
- 曾珍,刘至治,潘连德,等.2012.松江鲈鱼野生群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化[J].动物学研究,33(2):203-210.
- 郑伟,徐彦山,王秀兰,等.2007.应用 RAPD 和 SCAR 复合分子标志鉴定东北黄颡鱼[J].水生态学杂志,27(3):11-12.
- 周丽.2008.大鳍鳊遗传多样性及其线粒体控制区结构的研究[D].重庆:西南大学.
- 周伟,李旭,杨颖.2005.中国鮡科鳊群系统发育与地理分布格局研究进展[J].动物学研究,26(6):673-697.
- 周伟,李明会.2006.鮡科鱼类多样性与栖境的关系[J].云南农业大学学报,21(6):811-815,830.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 89: 583-590.
- Peakall R, Smouse P E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes, 6(1): 288-295.
- Thorpe J P. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics [J]. Annual Review of Ecology Systematics, 13(1): 139-168.
- Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 18(22): 6531-6535.

- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian population[J]. *Genetics*, 16: 91 - 159.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[A]. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada:20 - 25.
- Zhou W, Li X, Thomson A W. 2011. Two new species of the Glyptosternine catfish genus *Euchiloglanis* (Teleostei: Sisoridae) from southwest China with redescriptions of *E. davidi* and *E. kishinouyei* [J]. *Zootaxa*, 2871: 1 - 18.

(责任编辑 万月华)

RAPD Analysis of the Genetic Diversity of *Euchiloglanis longus* in Three Geographical Population of Lixianjiang

YANG Li-ping^{1,2}, ZHOU Wei²

(1. Faculty of Forestry, Southwest Forestry University; Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Kunming 650224, P. R. China;

2. College of Fisheries Henan Normal University, Xinxiang 453007, P. R. China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was utilized as a means of analyzing the genetic diversity of *Euchiloglanis longus*. Samples were collected from Jingdong (JD), Guoqing (GQ) and Dazai (DZ) in Lixianjiang basin. Twenty random primers were sifted out from 100 RAPD, from which 58 useful loci were detected, with 36 were polymorphic, amounting to 62.07%. The Nei's gene diversity and Shannon's information index of *E. longus* was 0.2378 and 0.3501 respectively. There are no unique amplified bands in the three geographical populations. AMOVA analysis indicated that 73.06% of variance was within population and 26.94% of variance was among population. Among the three populations, the genetic differentiation coefficient (G_{st}) and the gene flow (Nm) were 0.2104 and 1.8762. Principal coordinate analysis (PCoA), which was conducted by genetic distance among individuals, demonstrated that the three populations were almost separated.

Key words: *Euchiloglanis longus*; genetic diversity; RAPD