

研究简报

基于 RAPD 分析的高体 地理分化研究

易犁^{1,2} 王伟¹ 李墨怡^{1,2} 刘焕章¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学生命科学院, 武汉 430070)

A STUDY OF THE GEOGRAPHICAL DIFFERENTIATION OF *Rhodeus OCELLATUS* BASED ON RAPD ANALYSIS

YI Li^{1, 2}, WANG Wei¹, LI Mo-yi^{1, 2} and LIU Huan zhang¹

(1. Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;
2. College of Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词: 高体 ; RAPD; 遗传多样性; 地理分化
Key words: *Rhodeus ocellatus*; RAPD; Genetic diversity; Geographical differentiation
中图分类号: S965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001) 03- 0301- 04

高体 *Rhodeus ocellatus* (Kner) 属鲤科(Cyprinidae) 亚科(Acheilognathinae) 属(*Rhodeus*), 主要分布于黑龙江、辽河、黄河、长江、珠江、沅江、澜沧江等水系。由于分布区域广泛, 并有一定的形态差异, 所以曾被当作许多不同的种类被发表, 但在中国动物志中都被作为同物异名处理^[1]。目前高体 形态变异和地理种群的遗传分化等方面均缺乏系统研究。本文使用经过筛选的 21 个引物对四个不同地区的高体 的基因组进行 RAPD 扩增, 并对扩增的结果使用相应软件进行分析, 从而初步探讨高体 的遗传多样性现状以及我国淡水鱼类的地理分化问题。

1 材料与方法

用于 RAPD 分析的高体 的样本由中国科学院水生生物研究所鱼类学研究室分类组提供, 分别采自辽宁(辽河水系, 3 尾)、广西阳朔(珠江水系, 3 尾)、云南昆明(长江上游, 2 尾)和湖北武汉(长江中游, 2 尾)。

采用常规方法提取基因组 DNA, 并进行 RAPD 扩增, 方法描述见王剑伟等^[2]。所用引物为 Sangon 公司生产, 引物序列见表 1; 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后置于紫外透射检测仪观察照相记录。数据处理包括: 统计出各引物在不同样本中扩增条带并编成数据矩阵; 用 Shannon 信息指数计算种群遗传多样性; 利用 RAPD PLOT 软件计算各样本之间的遗传距离($d = 1 - S$), $S = NAB / (NA + NB)$, S 为 A、B 两样本间的相似率, NAB 为 A、B 两样本共有的条带数, NA 、 NB 分别为 A、B 两样本各自的条带数; 用 PHYLIP 3.5C 中的 Neighbor - Joining 命令分析结果并画出无根树(Unrooted tree)。

收稿日期: 2000- 07- 04; 修订日期: 2000- 11- 20
基金项目: 国家自然科学基金 39670101、49832010 资助
作者简介: 易犁(1978-), 男, 湖北武汉人, 本科学士
通讯作者: 刘焕章

2 结果

2.1 RAPD 引物序列及扩增结果

使用了 28 个引物, 经过筛选, 除去 3 个没有扩增产物的引物和 4 个扩增条带不甚清晰的引物, 最后选取了 21 个引物(S- 01 至 S- 21, 表 1), 并得到了 110 条确实可靠的条带(表 2)。

表 1 21 个引物的 DNA 序列及其扩增效果

Tab. 1 Primers and their amplified efficiency

引物 Primer	序列 Sequences	扩增效果 Efficiency	引物 Primer	序列 Sequences	扩增效果 Efficiency	引物 Primer	序列 Sequences	扩增效果 Efficiency
S- 01	GGCACGTAAG	++	S- 08	TCCCACGCAA	++	S- 15	GTGACAGGCT	++
S- 02	ACGTAGCGTC	+-	S- 09	T CAGAGCGCC	++	S- 16	AA GAGAGGGG	++
S- 03	AAGTCCGCTC	++	S- 10	GACAGGAGGT	++	S- 17	AGGTTGCAGG	++
S- 04	CCCAGTCACT	+-	S- 11	CAGTGCTGTG	+-	S- 18	AGCCTGAGCC	++
S- 05	CCACGGGAAG	++	S- 12	TGGCGTCCTT	++	S- 19	ACCA CCGACC	+-
S- 06	CAGCACTGAC	++	S- 13	ACACACGCTG	+-	S- 20	GAGTGGTGAC	++
S- 07	CCTCCAGTGT	++	S- 14	ACCGCCTGCT	++	S- 21	TGGTGACCA	++

++ , 扩增条带多而清晰, Excellent amplification, with many distinct and intense bands

+- , 扩增条带少但清晰, Good amplification, with a few distinct bands

表 2 21 个引物在不同地区的高体 样本中的扩增

Tab. 2 Data matrix of RAPD analysis for samples from 4 different areas

Liaoning- 1	101100001	1111	000011111	111	01110111	1110	111111	1110	1111111	01001
Liaoning- 2	101110100	1111	001111111	111	01110111	1110	111111	1110	1111111	01001
Liaoning- 3	101101000	1111	001111101	111	01110111	1110	101111	1110	1111111	01000
Yangshuo- 1	111100011	1111	111011111	101	11111111	1111	111011	1111	1111111	01011
Yangshuo- 2	111101001	1111	011011100	101	01111111	1111	111011	1111	1111111	01011
Yangshuo- 3	111100001	1111	011011110	101	01111111	1111	111011	1111	1111111	01011
Kunming- 1	101100001	1111	011001100	110	01110111	1110	101100	1110	1111111	01001
Kunming- 2	101100001	1111	011001101	110	01110111	1110	111100	1110	1111111	01001
Wuhan- 1	101100001	1111	001111101	110	01110111	1110	101101	1110	1111111	10101
Wuhan- 2	101101001	1111	001111101	110	01110111	1110	111111	1110	1111111	01001
Wuhan- 3	101100001	1111	001111101	110	01110111	1110	111111	1110	1111111	01001
Liaoning- 1	111 1111	001	11111	01111	11111	1111	111111	111	1110110	110101
Liaoning- 2	111 1111	001	11111	01111	11111	1111	111111	111	1110110	101101
Liaoning- 3	111 1111	011	11111	01111	11111	1111	111111	111	1110110	101101
Yangshou- 1	111 1111	111	11111	11111	11111	1111	111111	111	1110111	101101
Yangshou- 2	111 1111	111	11111	11111	11111	1111	111111	111	1110111	100101
Yangshou- 3	111 1111	111	11111	11111	11111	1111	111111	111	1110111	101111
Kunming- 1	111 1111	101	11111	01111	11111	1111	111111	001	1101011	101111
Kunming- 2	111 0111	101	11111	10111	11111	1111	111101	001	1101011	101111
Wuhan- 1	111 1111	011	11111	01011	11111	1111	111111	110	1000111	111101
Wuhan- 2	111 1011	011	11111	01011	11111	1111	111111	111	0100111	101101
Wuhan- 3	111 1111	011	11111	01011	11111	1111	111111	111	1100111	110101

0 代表在相对位置无带 0= band absent; 1 代表在相对位置有带 1= band present.
- 1、- 2、- 3 分别代表同一地区不同样本, - 1、- 2、- 3 indicate different samples from the same area. 不同的组合代表不同的引物 Numbers are grouped according to primers.

2.2 利用 Shannon 信息指数计算高体 种群的遗传多样性

参照恽锐等^[3]的方法, 用 Shannon 信息指数计算种群的遗传多样性: $h = - \sum P_i \log_2$, 式中为 P_i 某位点的表型频率, 包括有带个体的频率和无带个体的频率; h 为该位点的表型多样性, 表示个体在该位点上出现“有带”或“无带”的不确定性; 其平均值即为群体的遗传多样性。计算结果表明, 高体 种群平均每个位点的多样性指数为 0.1527, 由此可以看出高体 种群内的遗传多样性较低, 种群分化不大。

2.3 不同地区高体 样本间的遗传距离

扩增条带在地区内的差异很小, 来自同一地区的鱼类样本在相同引物下条带基本一致, 但不同地区的样本之间略有差异。通过 RAPDPLOT 软件以公式 $d = 1 - S$ 可以计算出 11 个样本间的遗传距离(表 3)。

表 3 不同地区的 11 个高体 样本间的遗传距离($d = 1 - S$)
Tab. 3 Genetic distances among 11 samples from 4 different areas ($d = 1 - S$)

11samples	Liaoning			Yangshou			Kunming			Wuhan		
Liaoning- 1	0.0000	0.0395	0.0575	0.0968	0.0939	0.0929	0.1124	0.1243	0.0930	0.0751	0.0460	
Liaoning- 2		0.0000	0.0395	0.1005	0.1087	0.0968	0.1163	0.1279	0.0971	0.0682	0.0621	
Liaoning- 3			0.0000	0.1075	0.0939	0.1038	0.1124	0.1361	0.0814	0.0520	0.0575	
Yangshou- 1				0.0000	0.0363	0.0256	0.1381	0.1381	0.1413	0.1135	0.1075	
Yangshou- 2					0.0000	0.0211	0.1250	0.1364	0.1397	0.1000	0.0939	
Yangshou- 3						0.0000	0.1124	0.1236	0.1381	0.1099	0.1038	
Kunming- 1							0.0000	0.0366	0.1138	0.1071	0.1006	
Kunming- 2								0.0000	0.1377	0.1190	0.1124	
Wuhan- 1									0.0000	0.0643	0.0465	
Wuhan- 2										0.0000	0.0289	
Wuhan- 3											0.0000	

从遗传距离表(表 3)可以看出遗传距离最小的是辽宁之间的样本(0.0395), 最大的是阳朔和武汉之间的样本(0.1413), 另外, Liaoning- 1 与 Wuhan- 3 的遗传距离(0.0460)小于其与 Liaoning- 3 的遗传距离(0.0575)。

2.4 高体 样本相互关系无根树

将 RAPDPLOT 软件分析所得样本间遗传距离输入计算机, 利用 PHYLIP 3.5C 中的 Neighbor-Joining 命令分析得出 11 个样本之间的相互关系, 用无根树来表示(图 1)。

从各样本之间的无根树可看出, 来自同一地区的样本之间的遗传距离较小并且它们在无根树中聚在一起, 因此可以得出结论: 来自同一地区的样本是属于同一种群的。同样, 还可看出, 与长江上游的样本相似性最高的并不是长江中游的样本, 而是珠江水系的样本; 此外, 辽河水系的样本与长江中游的样本却具有极高的相似性。由此可以认为长江中、上游之间的种群发生了分化。

3 讨论

3.1 关于高体 的遗传多样性

利用 Shannon 信息指数计算得出多样性指数为 0.1527, 这表明高体 的遗传多样性较低, 种群分化不大。王剑伟等通过对野生和近交稀有 鲫遗传多样性的研究发现四川汉源县大渡河水系、四川灌县岷江水系、四川彭县沱江水系 3 个地理群的 Shannon 遗传多样性指数分别为 0.3235、0.3075 和 0.2911, 这说明野生种群有较大遗传多样性, 其遗传分化是明显的^[2]。高体 的遗传多样性偏低, 有可能是高体 特殊的繁殖习性导致其演化、变异受局限从而造成遗传多样性不显著。当然, 也不排除

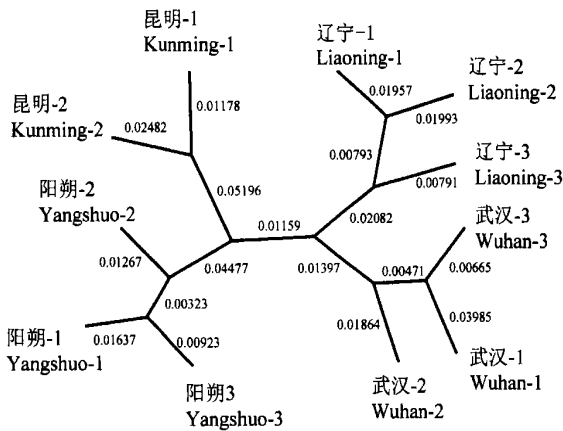


图 1 高体 11 个样本的遗传距离无根树

Fig. 1 Unrooted tree for 11 samples of *R. ocellatus* based on genetic distance

有可能是实验样本及引物较少所造成的实验误差; 因此, 数据还有待于进一步积累。

3.2 关于高体 的地理分化

从无根树(图 1)可看出, 来自同一地区的样本在无根树上聚在一起, 并且四个地区的情况均是如此, 由此可以认为同一地区种群分化很小。但是, 长江上、中游之间的鱼类样本有一定差异, 显示出有分化发生。刘焕章^[4]利用 PAE 法对东亚淡水鱼类生物地理学过程进行研究认为: 长江上、中、下游之间的鱼类有一定分化。本文的结果同这一观点吻合。李思发等^[5]通过对黑龙江、长江、珠江的鲢、鳙、草鱼进行同工酶研究发现, 黑龙江水系的样本与长江、珠江水系的样本遗传相似度小、遗传距离大; 长江水系与珠江水系的样本遗传相似度大、遗传距离小。他们认为可能是由于黑龙江水系是边缘群体, 其生态遗传有别于长江、珠江水系的中央群体。此外, 李思忠、方芳^[6]通过对四大家鱼的研究认为珠江流域的四大家鱼是由长江扩散而来的。但从本文以高体 作为实验材料得出的结果来看, 长江上游与中游之间有分化事件发生; 长江中游与辽河水系具较近的亲缘关系, 它们有着密切的交流, 而长江上游与珠江水系的亲缘关系较近。长江上游同珠江流域之间的特殊联系在其他物种中也有体现^[7]。长江中游与辽河水系的样本有较近的亲缘关系, 可能是第四纪冰期它们之间有交流。

参考文献:

[1] 陈宜瑜. 中国动物志(硬骨鱼纲·鲤形目)(中卷)[M]. 北京: 科学出版社. 1996

[2] 王剑伟, 王伟, 崔迎松. 野生和近交稀有 鲫的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 241—247

[3] 恽锐. 北京东灵山辽东栎种群 DNA 多样性的研究[J]. 植物学报, 1998, 40(2): 169—175

[4] 刘焕章. 东亚淡水鱼类生物地理学过程的初步研究[J]. 动物分类学报, 1998, 23(增刊): 49—55

[5] 李思发等. 长江、珠江、黑龙江的鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 1990

[6] 李思忠, 方芳. 鲢、鳙、青、草鱼地理分布的研究[J]. 动物学报, 1990. 3(3): 244—248

[7] 刘焕章, 陈宜瑜. 中国淡水鱼类的分布格局与东亚淡水鱼类的起源演化[J]. 动物分类学报. 1998, 23(增刊): 10—15