

中国胭脂鱼种群的遗传分析

孙玉华¹ 刘思阳^{1,2} 彭 智³ 余来宁⁴ 吴清江²

(1. 武汉大学生命科学院, 武汉 430072; 2. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;
3. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 4. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要: 采用 RAPD 和 PCR-RFLP 技术, 分析了长江中游两个中国胭脂鱼群体的遗传结构。50 个随机引物进行 RAPD 分析, 有 3 个引物显示了多态, 宜昌、金口群体内个体之间的遗传相似度分别为 0.9274、0.9313, 群体之间遗传相似度为 0.9000。12 个限制性内切酶分析了两群体线粒体 DNA ND-5/6 基因的限制性片段长度多态性, 仅内切酶 *NciI* 的酶切图谱显示了多态, 基因型间的核苷酸序列歧化距离为 0.235%, 核苷酸多样性为 0.004。分析表明, 长江中游两个中国胭脂鱼群体遗传结构较为单一, 群体之间表现了较为明显的遗传分化。

关键词: 中国胭脂鱼; 遗传多样性; RAPD; PCR-RFLP; ND-5/6

中图分类号: S965.126 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)03-0248-05

中国胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 为亚口鱼科 (Catostomidae) 惟一在亚洲大陆分布的种类, 主要分布于我国的长江和闽江流域。为国家 II 级保护动物。对中国胭脂鱼的种质资源、种群遗传结构进行调查评估, 是提出相应保护措施的基础性工作。已有一些关于中国胭脂鱼的地理分布、外观形态、年龄、生长和繁殖等生物学特性的研究工作^[1-3], 然而, 用分子生物学方法对中国胭脂鱼的种群遗传结构进行调查的报道还很少见到^[4]。

应用 RAPD 及 PCR-RFLP 技术分析研究这一濒危鱼类的遗传多样性, 分别在基因组 DNA 和线粒体 DNA ND-5/6 基因层次上探讨其遗传变异水平, 不仅能为进一步研究中国胭脂鱼不同地理种群之间的遗传分化奠定基础, 还将为开展对这一珍稀鱼类的遗传多样性修饰、遗传育种和繁殖保护工作提供科学依据, 具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 长江宜昌江段胭脂鱼群体 9 尾, 来自宜昌中华鲟所 (编号 Y1—9), 长江武汉金口江段 8 尾, 来自湖北省水产良种场 (编号 J10—17)。

1.2 总 DNA 抽提 参照宋平等^[5] 方法进行。

1.3 RAPD 扩增反应 RAPD 反应在珠海 Hema PCR 仪上进行。反应体系 25 μ L: 10 $\times$ Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, 2.5mmol/L dNTP 1 μ L, 0.5 μ mol/L 随机引物 1 μ L, 约 20ng DNA 模版, 1U 的 Taq 酶 (TaKaRa, China), 超纯水补至 25 μ L。覆盖 30 μ L 矿物油。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 36 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 共 40 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。每次反应设空白对照。在有少量 EB 的 1.5% 琼脂糖胶面点样 15 μ L, 于 1 $\times$ TBE Buffer 中电泳 2h。

1.4 RAPD 数据处理 以扩增产物呈现多态性的随机引物的 RAPD 标记条带作为统计分析的对象。每一条带记为一个位点, 当某条带出现时记为 1, 无则记为 0, 建立谱带矩阵。用公式 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算群体间及群体内遗传相似度, 其中 N_{xy} 表示 x 个体和 y 个体共有条带数, N_x 和 N_y 分别表示 x, y 各自拥有的条带数。遗传距离 $D = 1 - S^{[6]}$ 。

1.5 ND-5/6 标记基因片段的 PCR 扩增 用通用引物^[7] 扩增胭脂鱼线粒体 DNA 的 ND-5/6 基因片段, 引物序列为 (ND5G: CAACGGTGGTCTCTCAAGTC; ND6L: GGAACCAAAACTCTGGTGCAACTCC)。PCR 反应体系 25 μ L: 10 $\times$ 缓冲 Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, 2.5mmol/L dNTP 1 μ L, 0.5 μ mol/L 引物 1 μ L, 约 20ng

收稿日期: 2002-07-05; 修订日期: 2002-07-24

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号 204130416); 教育部留学回国人员启动基金; 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题 (批准号 2001FB09); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室开放课题; 湖北省自然科学基金资助 (批准号 204130416)

作者简介: 孙玉华 (1973—), 男, 湖北省荆州市人; 博士生; 从事鱼类遗传多样性研究

通讯作者: 刘思阳, sy-liu@whu.edu.cn

DNA 模版, 1U 的 Taq 酶(TaKaRa, China), 超纯水补至 25μL。覆盖 30μL 矿物油。扩增程序如下: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 40s, 48℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 80s, 共 38 个循环。最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物于 1% 的琼脂糖电泳检测。

1.6 ND- 5/6 基因片段限制性内切酶酶切 用 12 个限制性内切酶(Alu1, Acc2, Rsa1, Taq1, Msp1, Hae3, Mbo1, Hha1, Mse1, Hinf1, Dde1, NciI), 对扩增出的 ND- 5/6 片段酶切。酶切反应体系 15μL: ND- 5/6 扩增产物 4μL, 1U 的限制性内切酶, 酶切 Buffer 1.5μL, 超纯水补至 15μL。酶切条件按厂家说明进行。酶切反应产物于 1% 的琼脂糖电泳, 酶切片段分子量标定以华美公司 λDNA/ Hind III+ EcoRI Markers 为标准。

1.7 PCR-RFLP 数据处理 用字母 A, B, C 等来命名内切酶的酶谱。由各内切酶的酶谱构成样本的单倍型(Haplotypes) 。依据酶谱中酶切片段的数目和大小确定酶切位点, 用数字 1 和 0 表示酶切位点有无。依据基因型文件和内切酶文件, 应用 REAP 软件^[8] 估算单倍型间的核苷酸序列歧化距离、基因型多样性指数以及核苷酸多样性指数^[9]。

2 结果

2.1 RAPD 结果

对约 80 个引物(Operon 公司引物 Kit 中的 H, L, K, Q 组) 进行了筛选, 选择其中产生丰富 DNA 扩增片断的 50 个引物正式扩增(表 1)。

表 1 中国胭脂鱼基因组 DNA 随机扩增的引物及扩增情况
Tab. 1 RAPD primers and amplified results of Chinese sucker

引物 Primer	5' —3' 序列 Sequences	扩增片段数 Number of fragments.	引物 Primer	5' —3' 序列 Sequences	扩增片段数 Number of fragments.
Oph01	GGTCGGAGAA	6	Opk17	CCCAGCTGTG	10
Oph02	TCCGACGTGA	7	Opk18	CCTAGTCGAG	8
Oph03	AGACGTCCAC	10	Opq01	GGGACGATGG	5
Oph05	AGTCGTCCCC	12	Opq02	TCTGTCCGTC	12—13
Oph06	ACGCATCGCA	6	Opq03	GGTCACCTCA	8
Oph07	CTGCATCGTG	8	Opq04	AGTGCCTGA	8
Oph13	GACGCCACAC	8	Opq05	CCCGTCTTG	12—13
Oph14	ACCAGGTTGG	12	Opq06	GAGCGCCTTG	11
Oph15	AATGGCGCAG	4	Opq08	CTCCAGCGGA	8
Oph19	CTGACCAGCC	6	Opq09	GGCTAACCGA	8
Oph20	GGGAGACATC	3	Opq10	TGTGCCCAG	11
Opk01	CATTCGAGCC	10	Opq12	AGTAGGGCAC	6
Opk02	GTCTCCGCAA	6	Opq13	GGAGTGGACA	3
Opk03	CCAGCTTAGG	5	Opq14	GGACGCTTCA	4—6
Opk04	CCGCCCAAAC	9	Opq15	GGGTAACGTG	10
Opk06	CACCTTTCCC	8	Opq17	GAAGCCCTTG	6
Opk07	AGCGAGCAAG	12	Opq20	TCGCCCAGTC	8
Opk08	GAACACTGGG	7	Op101	ACCTGGACAC	13
Opk09	CCCTACCGAC	14	Op102	GGAGGAGAGG	8
Opk10	GTGCAACGTG	10	Op103	CAGAAGCCCA	9
Opk11	AATGCCCCAG	6	Op104	CCGCCTAGTC	7
Opk12	TGGCCCTCAC	3	Op105	TGTTCACCG	6
Opk13	GGTGTACCC	7	Op109	TGGAGAGCAG	8
Opk14	CCCGCTACAC	4	Op113	CTGGGGCTGA	4
Opk15	CTCCTGCCAA	6	Op115	TCATCCGAGG	5

筛选的 50 个引物中有 3 个引物扩增的带型具多态, 它们分别是 Opq02, Opq05, Opq14。图 1 例举了 Opq02 扩增的电泳图谱。

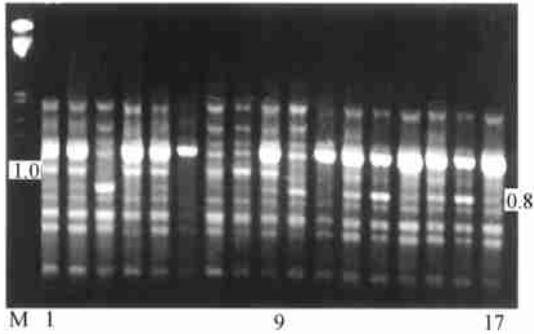


图1 引物 Opq02 扩增产物的电泳带型

Fig. 1 RAPD patterns amplified by primer Opq02

注: 编号由左至右, 依次为 Marker, Y 群体(1—9), J 群体(10—17)

From left to right: M (marker), Y population(1—9), J population(10—17)

以(Opq02, Opq05, Opq14) 3 个引物的 RAPD 数据分析中国胭脂鱼的种群结构, Y 群体(1—9) 内个体之间的遗传相似度平均为 0.9274, J 群体(10—17) 内个体之间的遗传相似度平均为 0.9313, 群体之间遗传相似度为 0.9000。

2.2 PCR-RFLP 结果

所有中国胭脂鱼个体都扩增出了长度约为2.2kb 的ND- 5/6 片段。12 个限制性内切酶对 ND- 5/6 片段酶切, 11 个限制性内切酶的酶切产物完全相同, 仅 NciI 酶产生了多态性(表 2)。

表 2 中国胭脂鱼 mtDNA 中ND- 5/6 基因 12 个限制性内切酶片段长度及限制类型

Tab. 2 The size of cleavage fragments of ND- 5/6 gene and restriction types for 12 enzymes

内切酶 Endonzymes	限制类型 Restriction types	片段大小(kb) Size of fragments
A h I	A	0.75, 0.5, 0.4, 0.2, 0.1
A cc II	A	0.9, 0.7, 0.6
D de I	A	0.9, 0.5, 0.45, 0.1, 0.1
H ae III	A	0.3, 0.3, 0.25, 0.25, 0.2, 0.15, 0.15
H ha I	A	1.2, 1.0
H inf I	A	0.6, 0.45, 0.4, 0.3, 0.25, 0.15, 0.05
M bo I	A	0.6, 0.45, 0.4, 0.35, 0.3, 0.1, 0.05
M se I	A	0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.15, 0.1
M sp I	A	0.7, 0.6, 0.4, 0.3, 0.1, 0.05
N ci I	A/B	0.8, 0.7, 0.6, 0.1/0.7, 0.6, 0.5, 0.2, 0.1
R sa I	A	0.8, 0.7, 0.4, 0.3
T aq I	A	1.8, 0.4

以 12 个限制性内切酶对 ND- 5/6 片段酶切图谱, 构建基因型文件和内切酶文件参与计算。基因型间的核苷酸序列歧化距离为 0.235%, 核苷酸多样性为 0.004。

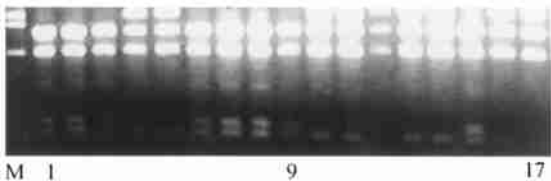


图 2 ND- 5/6 基因的 NciI 酶切图谱

Fig. 2 NciI cleavage patterns of ND- 5/6 genes

注: Y 群体中的 1、2、3、6、7、8、9 号及 J 群体中的 15 号个体显示 A 酶切类型, 其余个体都为 B 酶切类型。No. 1、2、3、6、7、8、9 from Y population and no. 15 from J population exhibited A restriction type. Others exhibited B restriction type.

3 讨论

RAPD 及 PCR-RFLP 技术具有很强的揭示遗传变异的能力, 在种群遗传结构的研究方面得到了很好的运用^[10—12]。本实验对约 80 个 RAPD 引物进行了筛选, 仅 3 个引物扩增的带型具多态。Y 群体内个体之间的遗传相似度平均为 0.9274, J 群体内个体之间的遗传相似度平均为 0.9313, 群体之间遗传相似度为 0.9000。在 PCR-RFLP 分析中, 12 个限制性内切酶只检测出 2 种基因型, 基因型间的核苷酸序列歧化距离为 0.235%, 核苷酸多样性为 0.004, 反映了胭脂鱼群体较低的遗传多样性水平。比较而言, 北美的 *Catostomus commersoni* 及 *Maxostoma robustum* 胭脂鱼群体遗传多样性要丰富一些^[13, 14]。

在对 RAPD 和 PCR-RFLP 的电泳图谱分析中, 发现的胭脂鱼群体之间出现了一定的不同地域遗传分化。从引物 Opq02 扩增的图谱看(图 1), 1.0kb、0.8kb 两标记带在宜昌和金口胭脂鱼群体的分布频率差异显著, 前者主要存在于宜昌群体, 后者主要存在于金口群体。对于不同地理江段的胭脂鱼群体, 由于遗传漂变及瓶颈效应, 某些位点的等位基因频率开始发生较大的变化。比如, 1.0kb 的引物结合位点, 在宜昌群体中出现频率为 78%, 而在金口群体中, 该位点频率仅为 25% (12, 15 号个体), 0.8kb 引物结合位点类似。从 NciI 酶切图谱看(图 2), Y 群体中, 具有限制类型 A 的个体占主导地位, 约为总数的 78%。J 群体中, 具有类型 B 的个体占主导地位, 约为总数的 88%。由于胭脂鱼群体只检测出 2 种基因型, 实际上述 A、B 两限制类型在 Y、J 群体中的分布频率即为 2 种基因型在 Y、J 中的分布频

率。该结果提示, 宜昌及金口江段胭脂鱼群体之间在一定程度上缺乏基因交流。

中国胭脂鱼曾是长江流域最主要的经济鱼类品种之一^[15], 然而由于经济的发展, 鱼类栖息地的破坏, 特别是酷渔滥捕, 胭脂鱼群体数量骤降; 另一方面, 葛洲坝水利枢纽建成后, 阻隔了长江中下游成熟的补充群体到上游去产卵, 成为了长江上下游胭脂鱼群体发生基因交流的一道屏障, 加之中国胭脂鱼胚胎发育期长, 性成熟晚, 资源一旦遭受破坏, 很难自然恢复。结果是, 胭脂鱼群体瓶颈效应突出, 遗传结构非常单一, 长江上下游胭脂鱼群体之间出现基因交流障碍。

鉴于中国胭脂鱼种质资源现状, 在种群复壮的过程中, 提高胭脂鱼后代群体的遗传多样性至关重要。因此在人工养殖过程中, 为避免随机交配的盲目性, 应选择遗传变异较大的个体作为亲鱼群体, 以丰富胭脂鱼后代群体的遗传多样性。

参考文献:

[1] Liu L H, Wu G X, Wang Z L, *et al.* A effect of the Gezhou Dam key water control project on sexul gland development and natural spawning of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) in the downstream below the Dam[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, **16**(4): 346—456 [刘乐和, 吴国犀, 王志玲. 葛洲坝水利工程对胭脂鱼性腺发育及自然繁殖的影响. 水产学报, 1992, **16**(4): 346—456]

[2] Wu G X, Liu L H, Wang Z L, *et al.* The age and growth of *myxocyprinus asiaticus* at Yichang reaches of Yangtze River below the Gezhou Dam[J]. *Freshwater Fisheries*, 1990, **2**: 3—7 [吴国犀, 刘乐和, 王志玲, 等. 葛洲坝下宜昌胭脂鱼年龄与生长. 淡水渔业, 1990, **2**: 3—7]

[3] Zhang C G, Zhao Y H. Early development of Chinese sucker [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2000, **46**(4): 438—447 [张春光, 赵亚辉. 胭脂鱼的早期发育. 动物学报, 2000, **46**(4): 438—447]

[4] Sun Y H, Liu S Y, Wang W, *et al.* Genetics diversity analysis of mitochondrial D-Loop region of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, **29**(2): 787—790 [孙玉华, 刘思阳, 王伟, 等. 中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析. 遗传学报, 2002, **29**(2): 787—790]

[5] Song P, Hu J R, Hu Y C, *et al.* Development of DNA markers for *Megalobrama amblycephala* Yñ with RAPD-derived PCR primers [J]. *J. Wuhan Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 2001, **4**(4): 493—497 [宋平, 胡珈瑞, 胡隐昌, 等. 依据 RAPD 片段克隆而建立的团头鲂 PCR 鉴定法. 武汉大学学报(理学版), 2001, **4**(4): 493—497]

[6] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, 1990, **7**: 478—486

[7] Park L K, Brainard M A, Dightman D A. Low level of intraspecific variation in the MtDNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) [J]. *Mol. Mar. Biol. Biotech*, 1993, **2**: 362—370

[8] McElroy D, Moran P E, Bemingham E, *et al.* REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data [J]. *Journal of Heredity*, 1992, **83**: 157—158

[9] Guoqing Lu, Sfa Li, Bernatchez L. MtDNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within the Yangtze River, China [J]. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 1997, **54**: 47—56

[10] Zhang H Y, Liu R Z, Zhang X W *et al.* Assessment of population genetic variation of grass carp and common carp using RAPD fingerprints [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(2): 168—175 [章怀云, 刘荣宗, 张学文, 等. 草鱼和鲤鱼群体遗传变异的 RAPD 分析. 水生生物学报, 1998, **22**(2): 168—175]

[11] Bielawski J P, Pumo D E. RAPD analysis of Atlantic coast striped bass [J]. *Heredity*, 1997, **78**: 32—40

[12] Saitoh. Kenji. Genetic variation and local differentiation in the Pacific cod *Gadus macrocephalus* around Japan revealed by mtDNA and RAPD markers [J]. *Fisheries Science*, 1998, **64**(5): 673—880

[13] Wirgin Isaac, Oppemann Tim, Stabile Joseph. Genetic divergence of Robust redhorse *Moxostoma rubustum* (Cypriniformes Catostomidae) from the Oconee River and the Savannah River based on MtDNA control region sequences [J]. *Copeia*, 2001, **2**: 526—530

[14] Pascale Lafontaine and J. J. Dodson. Intraspecific genetic structure of white sucker (*catostomus commersoni*) in northeastern North America as revealed by MtDNA polymorphism [J]. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 1997, **54**: 555—565

[15] Yu Z T, Deng Z L, Zhou C S, *et al.* Prognosis of the effects of the Gezhou Dam hydroelectric project on fish resources of the Yangtze River [C]. In: The Chinese Ichthyological Society, Transactions of the Chinese Ichthyological Society. Beijing: Science Press, 1985, (4): 193—205 [余志堂, 邓中, 周春生, 等. 长江葛洲坝水利枢纽兴建后鱼类资源变化预测. 中国鱼类学会编, 鱼类学论文集, 北京: 科学出版社, 1985, 第四集: 193—205]

GENETIC STRUCTURE OF CHINESE SUCKER(*MYXOCYPRINUS ASIATICUS*)
BY mtDNA AND RAPD MARKERS

SUN YuHua¹, LIU SiYang^{1,2}, PENG Zhi³, YU LaiNing⁴ and WU QingJiang²

(1. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. State key Laboratory of Fresh water Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072;

3. Fisheries college, Huazhong Agricultural university, Wuhan 430070;

4. Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Jinzhou 434000)

Abstract:Two molecular techniques, RAPD and PCR-RFLP, were used to detect population genetic structure of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) from the middle reaches of Yangtze River, Yichang section (Y population), and Jinkou section (J population). Total genome DNA was isolated from fin tissue by standard phenol-chloro-form extraction. Four kits of primers for RAPD analysis were from Operon technologies (oph, opl, opk, opq). Nei's genetic distance from RAPD pattern was calculated for population analysis. Of 50 RAPD primers, only 3 produced polymorphism. The genetic similarity within Yichang and Jinkou population is 0.9274, 0.9313 respectively. The genetic similarity between them is about 0.9000. 4μL aliquots of the PCR products of mitochondrial ND-5/6 genes were digested by 12 restriction enzymes. Estimation of mtDNA haplotype diversity followed Nei and Tajima's nucleotide diversity indices. Of 12 restriction enzymes types, 11 are monomorphic except NciI enzyme. Only two kinds of genotypes were found. The nucleotide diversity was 0.004, and the pairwise sequence divergence was about 0.235%. Meanwhile, We found differentiations between the two populations to some extent. From NciI enzyme cleavage patterns, the restriction pattern A was predominant (about 78%) in Y population, while in J population B was the major pattern (about 88%). In RAPD patterns amplified by primer Opq02, the 1.0 kb fragments appear mainly in Y population (about 78%), while the majority of the 0.8 kb fragments appear in J population (about 88%). Because of the booming pollution, and overexploitation, and because of the longer development and the sex mature period, Chinese sucker undertook a suddenly and sharply decreasing. Bottlenecks and genetic drift came into being. On the other hand, the Gezhou Dam has been the great barrier for the gene exchange of different populations. Therefore, the genetic structure of Chinese sucker is considerably simple and there was a trend of the differentiation of gene materials among different populations.

Key words:Chinese sucker; Genetic diversity; RAPD; PCR-RFLP; ND-5/6 gene