

似 属鱼类遗传多样性的 RAPD 分析及种的划分问题

张敏莹^{1,2} 杨秀平² 刘焕章¹

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

GENETIC DIVERSITY AND IDENTIFICATION OF SPECIES IN THE GENUS
PESUDOGOBIO BLEEKER BASED ON RAPD ANALYSIS

ZHANG Min Ying^{1,2}, YANG Xiu Ping² and LIU Huan Zhang¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词: 似 属; RAPD; 遗传多样性

Key words: *Pseudogobio*; RAPD; Genetic diversity

中图分类号: Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)03-0314-04

似 属 *Pseudogobio* Bleeker 隶属鲤形目 Cypriniformes、鲤科 Cyprinidae 的 亚科 Gobioninae。《中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目》(中卷)中又将我国的似 划分为 2 个种^[1]: 桂林似 *Pseudogobio guilinensis* Yao & Yang 和似 *Pseudogobio vaillanti* (Sauvage), 并列出这两个种的主要差异为: 桂林似 胸鳍长, 达到或超过腹鳍起点; 侧线鳞数目: 43—44; 尾柄长/尾柄高> 2, 分布于珠江的西江水系; 似 的胸鳍短, 后伸不达腹鳍起点; 侧线鳞数目: 39—42; 尾柄长/尾柄高< 2, 几乎遍布于全国各主要水系。最近对似 属鱼类形态变异的研究表明这两个种的差异呈连续的变化, 难以绝然分为两个种。作者对采自不同地区、具有不同形态特征的似 属鱼类进行了随机扩增多态 DNA(RAPD) 分析, 希望找出形态变异同遗传差异之间的关系, 从而进一步探讨似 属鱼类的物种划分问题。

1 材料与方 法

用于 RAPD 分析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(表 1)。基因组 DNA 的提取、RAPD 扩增反应、数据处理等方法同易犁等^[2]。

2 结 果

2.1 RAPD 引物序列及扩增结果

共做了 30 个引物, 经过筛选, 除去没有扩增产物和扩增

条带不很清晰的引物, 最后选取了 17 个扩增效果好的引物(表 2), 并得到了 115 条确实可信的带(表 3)。

表 1 13 个样本的形态特征及采样地点

Tab. 1 morphological characteristics and localities of 13 samples employed

样本编号	胸鳍长短	侧线鳞数目	尾柄长/尾柄高	采样地点
Liao 1	L	41	> 2	辽宁
Liao 2	L	43	> 2	辽宁
Liao 3	L	42	> 2	辽宁
Liao 4	L	40	> 2	辽宁
Wyr 1	L	42	< 2	江西婺源
Gt 1	L	44	> 2	广西桂林
Wyr 2	D	43	< 2	江西婺源
Gt 2	D	42	> 2	广西桂林
Wyr 3	D	42	< 2	江西婺源
Liao 5	D	41	> 2	辽宁
Wyr 4	D	42	< 2	江西婺源
Sr 1	S	40	< 2	江西上饶
Sr 2	S	41	< 2	江西上饶

注: L 表示胸鳍长, 后伸超过腹鳍起点。D 表示胸鳍达到腹鳍起点。S 表示胸鳍短, 后伸不达腹鳍起点。

收稿日期: 2001-09-16; 修订日期: 2002-11-20
基金项目: 国家自然科学基金(49832010)资助
作者简介: 张敏莹(1975—)女, 湖北省孝感市人, 硕士
通讯作者: 刘焕章

表 2 17 个引物的 DNA 序列及其扩增效果
Tab 2 Primers and their amplified efficiency

引 物 Primer	序 列 Sequence	扩增效果 Efficiency	引 物 Primer	序 列 Sequence	扩增效果 Efficiency
S-01	GTTTCGCTCC	+ +	S-09	TCCCA CGCAA	+ +
S-02	GTAGACCCGT	+ +	S-10	TGGCGTCCTT	+ +
S-03	CCTTGA CGCA	+ +	S-11	GGCATGACCT	+ +
S-04	CAGGCCCTTC	+ -	S-12	GAGTGGTGAC	+ +
S-05	AATCGGCTG	+ +	S-13	TGGGCGTCAA	+ +
S-06	CAAACGTCGG	+ -	S-14	TGGTGGACCA	+ +
S-07	ACGTAGCGTC	+ +	S-15	AAGTCGCTC	+ +
S-08	CCACGGAAG	+ +	S-16	CCAGCAGCTT	+ +
			S-17	AGGCGGAAC	+ -

注: + + , 扩增条带多而清晰 Excellent amplification with many distinct and intense bands
+ - , 扩增条带少而清晰 Good amplification with a few distinct bands

表 3 17 个引物的扩增结果
Tab. 3 Data matrix of RAPD analysis

样 本	扩增结果	样 本	扩增结果
sr-2	0101100000011000000100011000100000100011100000001010000	sr-2	11110110101011000110000100101100011000001101000001001111
sr-1	0101100000011000000100011000100000100011100000001010000	sr-1	11110111101011000110001001011000110000001001000000100111
wy-4	010001001101111100000100100110000110010100000001000001	wy-4	001000110100100000111001101011000100001011001000111110110
wy-3	00010000110110111000101000000101100110010100000001001001	wy-3	11100011010010110000110110101101000101001011000111110111
wy-2	0001000011011111100010100001101000110010100000001001000	wy-2	111000110101101100111101001011000010101100100010110111
wy-1	00110010110111110001010000100000110010100000101001001	wy-1	00100011010010010101111110001101000101011000000111110111
gl-2	000010100010110101100101010000101001100100111010101000	gl-2	1010011100001010100011010110001011010001010001100001001110
gl-1	100110101110100101100101010000001001100110110010111000	gl-1	111011110001100110111101111000101101000101000010000101110
liao-5	00010101110111010011000001100010000010100001100000001110	liao-5	0110001100001000001001010001100010000100001000010001001110
liao-4	000100011100110100110000111000100010010100001100000100001	liao-4	011000110000100100100101100010001100010000100001000101110
liao-3	000100011100110100110000111000100010010100001100000100001	liao-3	011000110000100100100101101110001000010000100001100100110
liao-2	000100011100110100110000111000100010010100001100000100010	liao-2	011000110000100100100101100110001000010000100001000100110
liao-1	000100011100110100110000111000100010010100001100000100000	liao-1	011000110000100100100101100010001000010000100001000100110

注: sr 代表上饶, wy 代表婺源, liao 代表辽宁, gl 代表鄱阳湖, -1、-2、-3、-4、-5 分别代表同一地区不同样本编号。0 代表在相对位置无带, 1 代表在相对位置有带 sr indicating Shang Rao City; wy indicat ing Wu Yuan County; liao indicating Liao Ning Province; gl indicating Poyang Lake; -1, -2, -3, -4, -5 indicating different samples from the same locality. 0= band absent; 1= band present.

2.2 遗传距离及样本之间关系无根树

似性指数(S), 从而得出各样本间的遗传距离(表 4)。

将表 3 的数据矩阵经过 RAPDPLOT3.0 可得各样本间相

表 4 不同样本之间的遗传距离(d= 1-S)

Tab. 4 Genetic distance among 13 samples from different areas

	Sr-2	sr 1	wy-4	wy-3	wy-2	wy-1	gt-2	gt 1	liar 5	liar 4	liar 3	liar 2	liar 1
sr 2	0.0000	0.1077	0.2846	0.3154	0.3077	0.3692	0.4077	0.4154	0.3538	0.3538	0.3615	0.3615	0.3462
sr 1		0.0000	0.3308	0.3615	0.3538	0.3692	0.4077	0.4154	0.3385	0.3538	0.3615	0.3462	0.3462
wy-4			0.0000	0.1846	0.1615	0.1615	0.4154	0.4231	0.3308	0.3308	0.3385	0.3538	0.3385
wy-3				0.0000	0.0846	0.1462	0.4462	0.4385	0.3769	0.3769	0.3692	0.3846	0.3692
wy-2					0.0000	0.1385	0.4385	0.4154	0.3538	0.3846	0.3769	0.3769	0.3615
wy-1						0.0000	0.4538	0.4462	0.3692	0.3692	0.3769	0.3769	0.3615
gt-2							0.0000	0.1462	0.3769	0.3769	0.3846	0.3846	0.3692
gt 1								0.0000	0.3846	0.3385	0.3615	0.3615	0.3462
liar 5									0.0000	0.1077	0.1000	0.0692	0.0846
liar 4										0.0000	0.0385	0.0385	0.0231
liar 3											0.0000	0.0308	0.0308
liar 2												0.0000	0.0154
liar 1													0.0000

从表中可以看出, 各样本间遗传距离最小值为 0.0154, 最大值为 0.4538。

根据遗传距离, 用 PHYLIP 3.5C 中的 Neighbor Joining 可得到表现各样本间相互关系的无根树(图 1)。从图 1 可以看出, 似 属鱼类分为三大类群: 江西类群、桂林类群、辽宁类群。

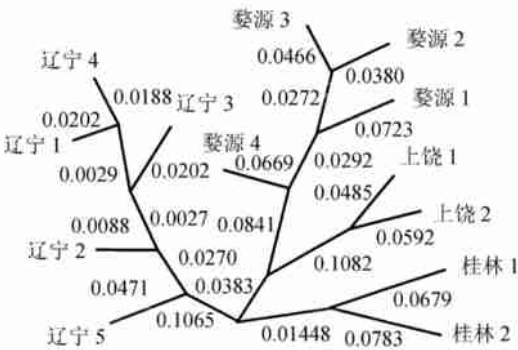


图 1 似 属鱼类 13 个样本的遗传距离无根树(数值表示长度)
Fig 1 Unrooted tree for 13 samples of *Pseudogobio* Blecker based on genetic distance(the numbers indicating branch lengths)

2.3 似 属鱼类的遗传多样性

参照恽锐等^[3]的方法, 用 Shannon 多样性指数计算种群遗传多样性: $h = - \sum p_i \log_2 p_i$, 式中 p_i 为某位点的表型频率, 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, 似 属鱼

类平均每个位点的多样性指数为 0.3473, 处于较高水平。

3 讨论

3.1 关于似 属鱼类的物种划分问题 似 属鱼类在中国的 2 个物种形态差异主要表现在侧线鳞数目、尾柄的高低和胸鳍的长短等方面。然而分析的结果表明这些特征在遗传上并不表现出一致性: 相同特征的样本在无根树上不聚在一起, 而是分散分布。无根树显示遗传差异同地理分化有关。由于 RAPD 分析针对的是基因组 DNA, 不存在母系遗传等方面的影响, 因此, 有理由认为现在所采用的划分桂林似 和 似的形态特征不表明这些样本之间有生殖隔离, 即这些样本应该属于同一物种。有关形态变异的研究结果也说明了这一点。

3.2 似 属鱼类的遗传多样性 利用 Shannon 信息指数计算得出的似 属鱼类遗传多样性指数为 0.3473, 为较高的水平。王剑伟等^[4]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、四川彭县沱江水系 3 个地理种群的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的遗传多样性, 其遗传分化是明显的。易犁等对高体 的 RAPD 分析发现遗传多样性为 0.1527, 处于较低的水平。似 属鱼类遗传多样性较高, 侧面说明了其形态差别较大的原因。

3.3 关于似 属鱼类的地理分化问题 从无根树上可以看出, 如果以三个不同地点的连接点 A 点为参照, 则桂林的样本长度最大(0.1448), 江西的样本(0.1224)次之, 辽宁的样本

(0.1065) 最小, 说明由于地理隔离, 不同地区的样本会产生遗传分化。易犁等对高体 地理分化的 RAPD 分析发现, 长江中游的样本较近于辽宁的样本而不是珠江的样本。本研究中虽然结论相似, 但差异程度并没有高体 大。

参考文献:

[1] Chen Y. Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes (II) [M]. Beijing: Science Press. 1998, 374—378. [陈宜瑜. 中国动物志•硬骨鱼纲•鲤形目(中卷)北京: 科学出版社, 1998, 374—378]

[2] Yi L, Wang W, Li M, *et al.* A study on the geographical differentiation of *Rhodeus oculatus* based on RAPD analysis[J]. *Acta Hydrobi-*

ologica Sinica, 2001, **25**(3): 301—304. [易犁, 王伟, 李墨怡, 等. 基于 RAPD 分析的高体 地理分化研究. 水生生物学报, 2001, **25**(3): 301—304]

[3] Yun R, Zhong M, Wang H, *et al.* Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling Mountain region, Beijing[J]. *Acta Botanica Sinica*. 1998, **40**(2): 169—175[恽悦, 钟敏, 王洪新, 等. 北京东灵山辽东栎种群 DNA 多样性的研究. 植物学报, 1998, **40**(2): 169—175]

[4] Wang J, Wang W, Cui Y. Genetic diversity of three *Gobiocypris rarus* populations and one inbreeding stock[J]. *Chinese Biodiversity*, 2000, **8**(3): 241—247[王剑伟, 王伟, 崔迎松. 野生和近交稀有 鲫的遗传多样性. 生物多样性. 2000, **8**(3): 241—247]