长江中华鲟遗传多样性变化

曾　勇, 危起伟, 汪登强

(中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术对 2000 年共 30 尾长江中华鲟(*Acipenser sinensis*)幼鲟遗传多样性进行了分析。共用 40 个10 bp 长的随机引物, 在 25 个可分析的引物中, 只有 OPK01, OPK02, OPK03, OPK09 和 OPK14RAPD-PCR 产物有多态现象, 多态引物占 20%。25 个引物共扩增出 101 条稳定的 DNA 带。其中 12 条为多态带, 多态座位比例为 9.9%。香农遗传多样性指数(H_0)为 2.633 2, 遗传多样性指数(H)为 0.026 1, 遗传相似性指数平均为 0.982 4, 遗传距离平均为 0.017 6。其遗传多样性明显低于葛洲坝截流以前。

关键词: 中华鲟(*Acipenser sinensis*); 随机扩增多态性 DNA(RAPD); 遗传多样性
中图分类号: Q16　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3096(2007)10-0067-03

中华鲟(*Acipenser sinensis*)为国家一级保护动物, 由于葛洲坝、三峡工程等水利设施的兴建, 切断了中华鲟的洄游路线, 改变了长江的水文格局, 对中华鲟的繁殖和生存极为不利。作者[1]曾报道了用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术研究的长江中华鲟的遗传多样性状况, 当时采集的是成鱼标本, 基本上反映了葛洲坝截流以前的情况。本研究的样本为 2000 年在长江下游采集的中华鲟幼鱼, 代表了葛洲坝截流以后长江中华鲟的遗传多样性结构, 也是若干年以后长江中华鲟繁殖群体的基础。为了确保数据的可靠, 作者的所有实验都严格按照以前的记录进行, 并对照以前的照片和模式图对 RAPD 条带进行判别。作者追踪报道了长江中华鲟的群体遗传学 RAPD 研究结果, 以期对目前长江中华鲟的遗传多样性有一个全面的了解。

1　材料与方法

1.1　材料

中华鲟 30 尾, 2000 年上半年采自长江下游, 均为幼鱼。鳍条组织 95% 的酒精保存。

1.2　方法

1.2.1　DNA 的提取

取 0.5 g 左右组织, 加入 STE(10 mmol/L Tris-HCl, pH= 8.0; 1 mol/L EDTA, pH= 8.0)于 4℃平衡, 以去除酒精。平衡结束后, 加入 STE 1 mL 混合匀浆, 加 30 μL(10 g/L)蛋白酶 K 和 150 μL(SDS10%)置于 50℃水浴中 2~4 h。常规酚抽提法除蛋白质。

1.2.2　RAPD-PCR 反应

在 Perkin Elmer 公司的 480 型 PCR 仪上进行。随机引物为美国 Operon Technologies 公司产品。对模板 DNA 进行浓度梯度稀释, 确定最佳使用浓度。RAPD-PCR 反应体系为: TaqDNA 聚合酶 1 单位, 200 μmol/L 每种 dNTP, 2 mmol/L $MgCl_2$ 和反应缓冲液(1×10) 2.5 μL, 反应总体积为 25 μL。PCR 反应过程共 45 个循环, 每循环包括 94℃变性 45 s, 36℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s。开始循环前预变性 5 min, 最后再于 72℃延伸 10 min。每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。

1.2.3　DNA 电泳

PCR 产物用 1.4% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)于 80 V 电压下电泳 2.5 h, 紫外灯下拍照。

1.3　数据分析

任意两两个体间遗传相似性和遗传距离用下列公式计算:

$$F = 2N_{xy}/N_x + N_y,\ P = 1 - F$$

F 为两个体间遗传相似度, P 两个体间遗传距离。N_x 和 N_y 分别为 X 和 Y 个体拥有的 RAPD 标记总数, N_{xy} 是 X 和 Y 两个体共享 RAPD 标记数[2]。

香农遗传多样性指数(Shannon's index of phenotypic diversity) $H_0 = \sum \pi_i \ln \pi_i$

π_i 为某一条带在某一群体中出现的频率, ln 为自

收稿日期: 2004-07-30; 修回日期: 2006-05-15
基金项目: 国家科学技术部专项基金项目; 中国水产科学研究院基金项目(2003-青-2)
作者简介: 曾勇(1967-), 男, 湖北荆州人, 副教授, 博士, 主要从事鱼虾病原及免疫的分子生物学研究, 电话: 0535-6902379; E-mail: zy110cn@yahoo.com.cn

然对数[3]。

为了把单态座位考虑进去,遗传多样性指数改为 $H = \sum \pi_i \ln \pi_i / N$, N 为所测的座位数。

2 结果

2.1 中华鲟 RAPD 测定结果

本研究共用 OPK 和 OPQ 全套共 40 个 10 bp 的核苷酸引物。其中 15 个引物无扩增产物或因效果不稳定不作分析。剩下的 25 种引物均能很好地重复以前[1]的结果。引物 OPK01, OPK02, OPK03, OPK09 和 OPK14 的 RAPD-PCR 扩增产生多态现象,多态引物占有效引物的 20%,RAPD 扩增效果见图 1。只有 OPQ08 例外,扩增无产物,结果见表 1。

DNA 带的数目从 1 到 6,25 种可分析的引物共产生 101 条带。平均每个引物产生 4.04 条清晰稳定的带。

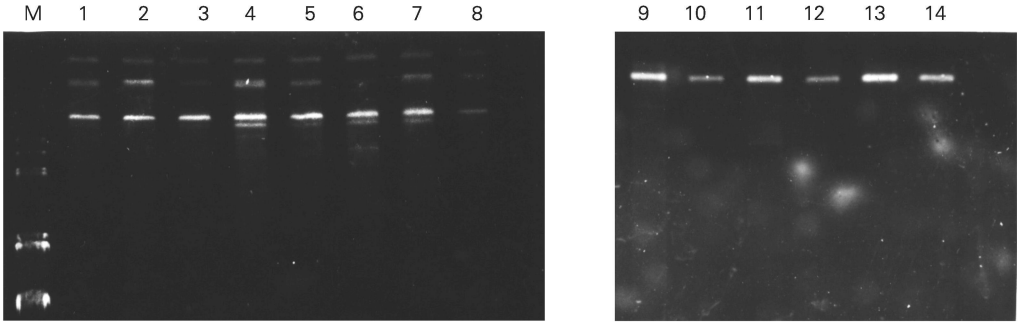

图 1 多态引物 OPK03(1-8)和单态引物 OPK18(9-14)的 RAPD 扩增图谱

Fig. 1 RAPD amplification profiles generated by use of primers OPK03(1-8) and OPK18(9-14)

Marker: λDNA/EcoRⅠ + HindⅢ Markers

表 1 不同引物的序列在中华鲟基因组的扩增结果

Tab. 1 Primer sequences used and amplification products obtained from different primers

引物	序列(5′-3′)	扩增带数
OPK01	CATTCGAGCC	3~5
OPK02	GTCTCCGCAA	1~2
OPK03	CCAGCTTAGG	3~4
OPK04	CCGCCCAAAC	4
OPK05	TCTGTCGAGG	5
OPK06	CACCTTTCCC	3
OPK09	CCCTACCGAC	2~4
OPK10	GTGCAACGTG	5
OPQ03	GGTCACCTCA	5
OPQ11	TCTCCGCAAC	4
OPQ14	GGACGCTTCA	4
OPQ16	AGTGCAGCCA	5
OPQ18	AGGCTGGGTG	1
OPK11	AATGCCCCAG	4
OPK13	GGTTGTACCC	5
OPK14	CCCGCTACAC	4~5
OPK15	CTCCTGCCAA	3
OPK18	CCTAGTCGAG	1
OPK19	CACAGGCGGA	5
OPK20	GTGTCGCGAG	6
OPQ02	TCTGTCGGTC	4
OPQ05	CCGCGTCTTG	4
OPQ13	GGAGTGGACA	5
OPQ15	GGGTAACGTG	4
OPQ17	GAAGCCCTTG	4

2.2 中华鲟遗传多样性分析

在统计的 101 条 DNA 带中,有 10 条 DNA 带呈现多态现象,如果以每条 DNA 带作一座位计,多态座位占总座位比例为 9.9%。幼鱼的 H_0 为 2.633 2, H 为 0.026 1。

对 30×29 阵矩的遗传相似性指数分析表明,两个体间遗传相似度最大为 1.000,最小为 0.959 2,平均为 0.982 4。个体间的遗传距离最大为 0.040 8,最小为 0,平均为 0.017 6。在两组 40 种引物中 OPK 引物比 OPQ 引物的扩增效果好,且产生多态的引物比例也高。把一个 DNA 带区作为一个座位,多态座位通常存在 DNA 带有和无两种情况,可以视为一对等位基因,从而可以确定有带的等位基因频率[4]。表 2 统计了各多态座位等位基因频率和遗传多样性值。

3 讨论

3.1 利用 RAPD 技术进行遗传多样性监测的可行性

RAPD 技术自从建立以来,已被广泛地用于遗传多样性分析。但由于其高度的灵敏性,对其实验结果的可重复性产生了影响。但作者的研究结果表明,只要严格控制实验条件,RAPD 技术完全可以作为一个经济、快速、实用的方法,对遗传多样性变化进行监测。本研究中除 OPQ08 引物外,其余引物均能重复

表 2　中华鲟多态座位等位基因频率和多样性指数的分布

Tab. 2　Allele frequencies and genetic diversity among polymorphic loci

多态座位	基因频率	多样性指数
OPK01-1	0.600 0	0.306 5
OPK01-2	0.200 0	0.321 9
OPK01-4	0.100 0	0.230 3
OPK01-5	0.300 0	0.361 2
OPK02-2	0.566 7	0.321 9
OPK03-1	0.633 3	0.289 3
OPK09-1	0.933 3	0.064 4
OPK09-2	0.966 7	0.032 7
OPK09-4	0.266 7	0.352 5
OPK14-4	0.266 7	0.352 5
H_0		2.633 2
H		0.0261
N = 101		

注: N 为座位数; 引物后的编号为该 DNA 带在引物所有扩增带的位置, 按 DNA 带的大小从小到大编号

文献[1] 的结果。OPQ08 引物扩增不出条带的原因, 一方面可能是基因突变的结果, 另一方面也存在统计上的遗漏。

3.2　长江中华鲟遗传多样性变化

比较前后两次的研究结果(表 3), 可以看出长江截流以后所产生的中华鲟, 其遗传多样性明显低于截流以前, 虽然截流后用的是幼鱼样本, 可以想象, 经过若干年后在此基础上成熟的亲鱼, 其多样性会进一步下降。尽管两次实验在 OPQ08 引物扩增的结果上存在一定差异, 但其它引物重复良好。例如, 针对扩增多态最丰富的 OPK01 引物, 以前可以扩增出 12 种基因型[1], 而本研究只扩到 9 种。且以前最丰富的一种基因型(占总数的 24.56%), 本研究只检测到一例, 占总数的 3.33%, 基因型的详细变化另文报道。

表 3　两次研究结果的比较

Tab. 3　comparation of the data from two experiments

文献	多态座位比例(%)	H_0	H	平均遗传相似度	平均遗传距离
[1]	11.1	3.609 0	0.033 4	0.974 3	0.026 7
本文	9.9	2.633 2	0.026 1	0.982 4	0.017 6

产生上述结果的原因有两种可能: 当人工放流群体占主导地位时, 由于人工放流群体遗传多样性偏低, 很可能导致长江中华鲟的遗传多样性降低。但近年的标志试验结果显示, 人工放流 10~ 15 cm 幼鲟 10 万尾时, 放流幼鲟在长江口的贡献率不到 5%。由此说明, 目前葛洲坝下中华鲟自然繁殖仍然对中华鲟物种资源延续起主导作用。因此, 其原因可能在于截流以后中华鲟产卵场的变化, 由截流以前长江上游的 400 km 江段, 减少到目前葛洲坝下仅 3 km 江段。一部分亲鱼在适应新的产卵场中遭到淘汰(捕捞到流产的亲鱼可以佐证), 从而降低了长江中中华鲟的遗传多样性。

结果虽与张四明等[5] 对 106 尾 1995~ 2000 年成鱼样本的线粒体 D-loop 测序分析结果有所不同, 但其研究中可参与繁殖的样本占所测样本的比例无法确定, 鉴于流产亲鱼存在的事实, 通过对长江中华鲟幼鱼遗传多样性的监测, 应能更客观地反映长江中华鲟遗传多样性的走向。

参考文献:

[1] 张四明, 邓怀, 晏勇, 等. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, **31**(1): 1-7.

[2] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. **Mol Biol Evol,** 1990, 7: 478-484.

[3] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, *et al*. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. **Genome,** 1995, 38: 201-210.

[4] Harding G C, Kenchington E L, Bird C J, *et al*. Genetic relationships among subspecies of the American lobster (*Homarous americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA [J]. **Can J Fish Aquat Sci,** 1997, **54**(8): 1 762-1 771.

[5] Zhang S M, Wang D Q, Zhang Y P. Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. **Cons Genet,** 2003, 4: 673-683.

(下转第 **76** 页)

(上接第 69 页)

The variation of genetic diversity of Chinese sturgeon(*Acipenser sinensis*) in the Yangtz River

ZENG Yong, WEI Qi-wei, WANG Deng-qiang
(Yangtz River Fisheries Research Institute, the Chinese Academy of Fishery Science, Jingzhou 434000, China)

Received: Jul., 30, 2004
Key words: Chinese sturgeon (*Acipensert sinensis*); random amplification of polymorphic DNA(RAPD); genetic diversity

Abstract: Totally 30 samples collected in 2000 were analyzed by random amplification of polymorphic DNA(RAPD). 40 decamer primers were applied for analysis and only 25 primers gave stable results. Among 25 primers studied only 5 primers(20%) such as OPK01, OPK02, OPK03, OPK09 and OPK14 produced polymorphic bands. Total 101 bands (locus) were obtained using 25 primers. Out of the 101 bands (locus), 10 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic loci was about 9.9%. The Shannon's index of phenotypic diversity H_0= 2.633 2. The genetic diversity H= 0.026 1. Genetic similarity and genetic distance between individuals were 0.982 4, 0.017 6 respectively. The genetic diversity of the samples in this study was lower than that before the construction of Gezhouba dam.

(本文编辑: 刘珊珊)