

中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究*

张四明 邓 怀 晏 勇 汪登强 吴清江[†]

(中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000)

[†](中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术进行了连续 3 年 (1995—1997) 共 70 尾来源于长江水系中华鲟样本遗传分析。共用了 40 个 10bp 长的随机引物, 在 26 种可供分析的引物中, 只有 OPK01、OPK02、OPK03、OPK09、OPK14 和 OPQ08 RAPD-PCR 产物有多态现象, 多态引物占 23%。26 个引物中共扩增出 108 条稳定的 DNA 带。其中 12 条带为多态带, 多态座位比例为 11.1%。个体间遗传距离变动为 0.951 0—1.000 0, 平均为 0.974 3。1995、1996 和 1997 年的遗传多样性指数 (H) 分别为 0.032 7、0.031 2 和 0.035 4。3 年样本的综合遗传多样性指数 (H) 为 0.033 4。比较而言, 中华鲟天然群体核 DNA 水平的遗传多样性仍较低。

关键词 中华鲟 RAPD 遗传结构 遗传多样性 遗传保护

学科分类号 Q347

中华鲟是中国一级保护的珍稀水生动物, 蛋白质电泳研究结果初步表明, 其天然群体蛋白质水平的遗传多样性比较贫乏 (张四明等, 1999)。考虑到蛋白质电泳技术所检测到的遗传变异有限 (Hill *et al.*, 1996), 本研究采用随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术 (Williams *et al.*, 1990) 对中华鲟天然群体进行进一步研究, 从不同侧面阐明中华鲟天然群体在核基因组的遗传变异。从已发表的文献看, RAPD 研究大量集中在植物上, 关于鱼类 RAPD 研究国内外仍未见很多报道 (Bardakci *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1995; Bielawski *et al.*, 1996; Caccone *et al.*, 1997; 邓怀等, 1998)。本文报道中华鲟群体遗传学的 RAPD 研究结果, 以期中华鲟资源的监测和保护提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 70 尾, 除 1 尾幼体外, 其余全部为成体。分别于 1995 年、1996 和 1997 年 10—11 月份采自湖北宜昌至沙市的长江江段。其中, 1995 年样本 40 尾, 1996 年样本 17 尾, 1997 年样本 13 尾。新鲜肌肉组织于低温条件下运回实验室后置于

* 国家自然科学基金资助项目, 39600112 号。张四明, 男, 出生于 1963 年 2 月, 博士, 副研究员, E-mail: zhangsm@yfi.ac.cn

收稿日期: 1998-01-19, 收修改稿日期: 1998-05-15

-80℃低温冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取方法 取0.5g左右组织,加STE(10mmol/L Tris-HCl, pH=8.0; 1mol/L EDTA, pH=8.0)1ml混合匀浆,加30μl(10mg/ml)蛋白酶K和150μl(10%)十二烷基硫酸钠(SDS)置于50℃水浴中2—4h。按常规酚抽提法除蛋白质。

1.2.2 RAPD-PCR反应 在Perkin Elmer公司产的480型PCR仪上进行。随机引物是美国Operon Technologies公司产品。模板DNA浓度的确定是先把DNA浓度作成不同浓度梯度,进行PCR扩增,然后根据扩增效果确定反应体系DNA浓度。RAPD-PCR反应体系为:TaqDNA聚合酶1单位,200μmol/L每种dNTP,2mmol/L MgCl₂和反应缓冲液(1×10)2.5μl,反应总体积为25μl。PCR反应过程共45循环,每循环包括94℃变性45s,36℃退火45s,72℃延伸90s。开始循环前预变性5min,最后循环后于72℃延伸10min。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80V电压下电泳2.5h,紫外灯下拍照。

1.3 数据分析

任意两个体间遗传相似性和遗传距离用下列公式计算:

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

式中, F 为两个体间遗传相似度; P 为两个体间遗传距离; N_x 和 N_y 分别为X和Y个体共同拥有的RAPD标记总数, N_{xy} 是X和Y两个体共享RAPD标记数(Lynch,1990)。

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 为自然对数(Wachira *et al.*, 1995)。

为了把单态座位考虑进去,遗传多样性指数改为 $H = \frac{\sum \pi_i \ln \pi_i}{N}$, 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10bp的核苷酸引物。其中有14个引物无扩增产物或因效果不稳定不作分析。在剩下的26种引物中,引物OPK01、OPK02、OPK03、OPK09、OPK14和OPQ08的RAPD-PCR扩增产生多态现象,多态引物占总引物(指带比较稳定的引物)的23%。

DNA带的数目从1到6条,在26种可分析的引物中,共产生108条带。平均每个引物产生4.2条清晰稳定的带。在一些多态DNA带中,只有那些重复实验中可以重复的多态带方可计算在内,那些在一次实验中出现有差异而无法重复的不作多态座位计。因而所有多态引物都进行重复实验,以确定那些真正的多态带。单态引物只需一次实验即可,因为在70个个体中均出现单态,说明并非巧合,该引物扩增的DNA带为单态无疑。表1为所用引物的DNA序列以及RAPD的扩增情况。图1为多态引物OPK01和单态引物OPQ17引物的RAPD扩增效果。

2.2 中华鲟遗传多样性分析

在总共可辨的108条DNA带中,有12条DNA带呈现出多态现象,如果以每条DNA

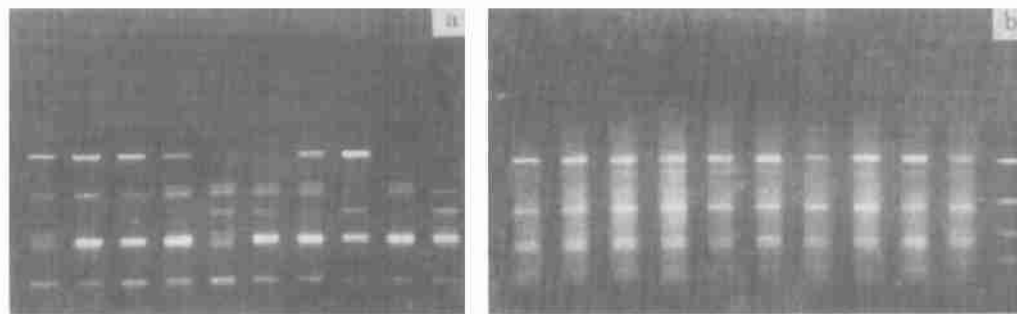


图1 多态引物OPK01(a)和单态引物OPQ17(b)的RAPD扩增图谱

Fig.1 RAPD amplification profiles generated by use of primers OPK01(a) and OPQ17(b)

图最右边一列为标记物(Marker),分子量大小自上而下分别为1 543bp,994bp,695bp,515bp和237bp

表1 不同引物序列及RAPD-PCR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	引物	序列(5' -3')	扩增带数
OPK01	CATTGAGCC	4-6	OPK11	AATGCCCCAG	4
OPK02	GTCTCCGCAA	1-2	OPK13	GGTTGTACCC	5
OPK03	CCAGCTTAGG	3-4	OPK14	CCCGCTACAC	4-5
OPK04	CCGCCCAAAC	4	OPK15	CTCCTGCCAA	3
OPK05	TCTGTGAGG	5	OPK18	CCTAGTCGAG	1
OPK06	CACCTTCCC	3	OPK19	CACAGGCGGA	5
OPK09	CCCTACCGAC	2-4	OPK20	GTGTCGCGAG	6
OPK10	GTGCAACGTG	5	OPQ02	TCTGTGCGTC	4
OPQ03	GGTCACCTCA	5	OPQ05	CCGCGTCTTG	4
OPQ08	CTCCAGCGGA	5-6	OPQ11	TCTCCGCAAC	4
OPQ13	GGAGTGACA	5	OPQ14	GGACGCTTCA	4
OPQ15	GGGTAACGTG	4	OPQ16	AGTGCAGCCA	5
OPQ17	GAAGCCCTTG	4	OPQ18	AGGCTGGGTG	1

带作一座位计,多态座位占总座位比例(P)为11.1%。如果不考虑单态引物,只计算多态引物,多态座位比例可达到43.0%。1995、1996、1997年和三年混合样本的香农遗传多样性指数(H_0)分别为3.527 5、3.365 0、3.728 3和3.609 0。遗传多样性指数(H)1995、1996和1997年分别为0.032 7、0.031 2和0.035 4,三年样本综合遗传多样性指数为0.033 4。

对70×69矩阵的遗传相似性指数分析表明,两个体间进行遗传相似度最大为1.000 0,最小为0.951 0,平均为0.974 3。个体间的遗传距离最大为0.049 0,最小为0,平均为0.026 7。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(Harding *et al*, 1997),表2统计了各多态座位等位基因频率和遗传多样性值在三年样本中的分布情况。

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

项 目	1995年(N=40)		1996年(N=17)		1997年(N=13)		3年综合值(N=70)	
	基因频率	多样性指数	基因频率	多样性指数	基因频率	多样性指数	基因频率	多样性指数
OPK01-1	0.400 0	0.366 5	0.470 6	0.354 7	0.307 7	0.362 7	0.400 0	0.366 5
OPK01-2	0.625 0	0.293 8	0.470 6	0.354 7	0.307 7	0.362 7	0.528 6	0.337 0
OPK01-4	0.125 0	0.259 9	0.176 5	0.306 1	0.230 8	0.338 4	0.157 1	0.290 8
OPK01-5	0.275 0	0.355 0	0.117 6	0.251 8	0.153 8	0.288 0	0.214 3	0.330 1
OPK02-2	0.525 0	0.338 3	0.294 1	0.359 9	0.307 7	0.362 7	0.428 6	0.363 1
OPK03-1	0.725 0	0.233 1	0.529 4	0.336 7	0.615 4	0.298 8	0.657 1	0.275 9
OPK03-2	0.700 0	0.249 7	0.941 2	0.057 0	0.769 2	0.201 8	0.771 4	0.200 2
OPK08-5	0.600 0	0.306 5	0.411 8	0.365 4	0.461 5	0.356 9	0.528 6	0.337 0
OPK09-1	0.775 0	0.197 5	0.764 7	0.205 1	0.769 2	0.201 8	0.771 4	0.200 2
OPK09-2	0.650 0	0.280 0	0.705 9	0.245 9	0.230 8	0.298 8	0.657 1	0.275 9
OPK09-4	0.475 0	0.353 6	0.705 9	0.245 9	0.230 8	0.298 8	0.557 1	0.325 9
OPK14-4	0.625 0	0.293 8	0.647 1	0.281 7	0.461 5	0.356 9	0.600 0	0.306 5
香农多样性值(H_a)	3.527 5		3.365 0		3.728 3		3.609 0	
平均值($n=12$)	0.294 0		0.280 4		0.310 7		0.300 8	
综合平均值(H) ($n=108$)	0.032 7		0.031 2		0.035 4		0.033 4	

N 为样本数; n 为座位数。引物后的编号为该DNA带(座位)在引物所有扩增带的位置,按DNA带的大小从小到大的编号

3 讨论

3.1 中华鲟 RAPD 数据的处理及遗传多样性评价

在历史上,中华鲟在淡水生活时期(指繁殖洄游和幼鱼降河洄游)主要分布长江和珠江等水域(四川省长江水产资源调查组,1988),通常称为长江群体和珠江群体。现在基本上只有长江中华鲟一个地理群体,中华鲟所有的遗传变异基本来源于长江这惟一的群体内。鉴于张四明等(1999)的蛋白质电泳研究发现其蛋白质水平的遗传多样性较低,为了进一步阐明中华鲟天然群体遗传结构和遗传多样性特征,同时积累本底资料,本研究进行了长江群体连续三年大样本(70尾样本)和大规模的遗传扫描(40个随机引物RAPD扩增),这在动植物中特别是濒危动物方面是少见的。近年来,在植物遗传多样性研究中引入香农遗传多样性指数,使研究结果具有可比性(Chalmers *et al*, 1992; Wachira *et al*, 1995)。但他们没有考虑到所测定座位总数,这对经过筛选过只产生多态的引物尚可,这样一来,多态座位比例(全部为100%)就无意义。譬如,本研究如果只考虑用香农遗传多样性指数的话,只用OPK01、OPK02、OPK03、OPK09、OPK14和OPQ08六个引物所得到香农遗传多样性值的和本研究26个引物测得的香农遗传多样性值是完全一样的,显然不合理。本研究中也引入香农遗传多样性指数,但作者认为必须象蛋白质多态分析一样把所测得的座位总数加以考虑进去,这样就更客观地反映遗传多样性本质。由于鱼类的RAPD资料非常少,且均没有进行遗传多样性指数的分析,因而很难从目前的RAPD资料得出直接结论。因此只有用多态位点比例这一参数进行横向比较。根据脊椎动物各大类群由同

工酶测得的遗传多样性数据相差不大这一事实,可以间接同鱼类和其它一些脊椎动物的 RAPD 的数据进行比较。兰宏等(1996)对 6 只滇金丝猴的 RAPD 遗传多样性研究表明,20% 的 RAPD 标记为多态,个体间的遗传距离为 0.052,并得出遗传多样性低的结论。Bielawski 等(1996)用 RAPD 技术研究了大西洋沿岸条纹鲈(*Morone saxatilis*)不同群体遗传结构,在可分析的引物中,75% 的引物为单态引物,并指出大西洋沿岸条纹鲈核基因组遗传变异较低。本文中结果显示中华鲟群体 77% RAPD 引物为单态引物,只有 11.1% 的 RAPD 标记(座位)为多态,遗传距离为 0.027,从侧面也初步证实中华鲟核基因组遗传变异较低,这一结论也得到张四明等(1999)反映核基因组遗传变异的蛋白质电泳研究的初步证实。在研究中还发现,有些个体间的遗传相似性很高,达到 1.000,尽管在理论上几乎是是不可能的,但至少说明了这些个体间的亲缘关系非常近。用亲缘关系非常近的鱼进行人工繁殖,得到的后代的遗传变异将会很低,对环境的适应力将会下降,在人工繁殖过程中应借助遗传标记选择个体间的遗传相似性低的个体进行交配,避免近亲交配,以提高子代的生存力。

3.2 中华鲟 RAPD 资料对其资源监测保护的意义

本文的资料可以说是一历史性的资料,因为样本绝大多数为葛洲坝截流前出生的个体,遗传多样性主要反映了葛洲坝截流前的情况,这一点在蛋白质水平遗传多样性研究一文中作过分析(张四明等,1998)。所以它不仅填补了葛洲坝水利工程截流前所繁殖的中华鲟的遗传多样性资料空白,同时也反应了三峡大坝截流前中华鲟天然群体的遗传多样性特征,这无疑为今后长远地监测中华鲟资源的变动特别是葛洲坝和三峡大坝对中华鲟资源的影响提供了本底资料,也是制定保护措施的理论依据。同时也说明中华鲟在核基因组的遗传变异较小在葛洲坝水利工程截流前业已存在。造成遗传多样性较小的原因,可能与中华鲟在过去的某一时期经历了遗传瓶颈效应有关,但目前还无直接的证据证实这一点。本研究采用的 RAPD 技术具有灵敏度高,多态性丰富等优点。只需要少量鳍条和血液提取的极微量的 DNA 便可进行研究,为今后开展非致死性监测创造了条件。在将来的监测过程中可以选用该文报道的几种多态性引物(序列见表1),使工作量大大减少。从过去由蛋白质电泳得到的遗传多样性资料和本文结果来看,中华鲟遗传多样性贫乏的事实不容忽视,尽管中华鲟遗传多样性贫乏与葛洲坝的建设无直接关系,但葛洲坝和三峡大坝的建设必定会对中华鲟物种的遗传多样性方面产生不利影响,这已在资源量上表现出来,遗传多样性资料还待将来收集比较。当然,遗传多样性贫乏并不一定会直接造成物种的消亡,有些基因型可能对某一特定环境产生了高度适应。但从长远来看,遗传多样性贫乏显然对物种的生存与进化是不利的。为了保护中国这一珍贵水生动物遗传资源,除了加强渔政管理,国家应严禁以各种理由捕杀中华鲟,因为经国家有关部门批准的捕杀中华鲟成体每年有几十条,对中华鲟本已脆弱的群体更是雪上加霜。应减少或取消人工繁殖放流活动,过去的人工繁殖是采取杀鱼取卵和精子的方式进行的,由于中华鲟的数量已很少,有些单位为了达到完成批准的捕杀指标,不加任何选择的把一些没有性成熟的鱼(准备翌年产卵鱼)和过熟的鱼也杀了,况且,这类鱼占绝大多数。目前的人工繁殖屠杀中华鲟亲鱼造成的资源破坏能否靠有限的放流鱼苗中得到弥补,是政府部门和科研单位需要正确对待的问题。人工繁殖方式也不可避免地会造成近亲交配。在自然条件下,由于中

华鲟性成熟的年龄较长,可能数以万计的鱼苗中经过十余年漫长岁月只有一尾幸运者达到性成熟,这尾性成熟的鱼如果没有人为的捕杀,在今后成活的比例无疑是非常高,且可以反复进行繁殖活动。因此,国家对人工繁殖放流活动要持谨慎态度,如要进行人工增殖活动,要尽量借助已经建立的精子冷冻保存技术和遗传标记技术,减少亲本的伤亡和子代由近亲交配所产生的适应能力差的状况,以维持中华鲟天然群体的健康发展。

参 考 文 献

- 邓 怀,张四明,汪登强等,1998. 十种常见淡水鱼类的 RAPD 鉴定. 淡水渔业, 28(1): 8—10
- 四川省长江水产资源调查组, 1988. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究. 成都: 四川科学技术出版社, 32—173
- 兰 宏,张文艳,王 文等,1996. 滇金丝猴的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析. 中国科学(C辑), 26(3): 244—249
- 张四明, 1988. 分子生物学技术及其在渔业科学中的应用. 水产学报, 22(增刊): 97—106
- 张四明, 邓 怀,危起伟等, 1999. 中华鲟天然群体蛋白质水平遗传多样性贫乏的初步证据. 动物学研究, 20(2): 93—98
- Bardacki F, Skibinski D O F, 1993. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity, 73: 117—123
- Bielawski J P, Pumo D E, 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast strip bass. Heredity, 78: 32—40
- Caccone A, Allegrucci G, Fortunato C *et al*, 1997. Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. J Heredity, 88: 316—324
- Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I *et al*, 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. Heredity, 69: 465—472
- Harding G C, Kenchington E L, Bird C J *et al*, 1997. Genetic relationships among subspecies of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. Can J Fish Aquat Sci, 54(8): 1 762—1 771
- Hill D M, Moritz C, Mable B K, 1996. Molecular Systematics, the Second Edition. Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc. Publishers, 515—543
- Lynch M, 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Biol Evol, 7: 478—484
- Nilsson J, Schmitz M, 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Arctic Char. Nordic J Freshw Res, 71: 372—377
- Wachira F N, Waugh R, Hackett C A *et al*, 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. Genome, 38: 201—210
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. Nucl Acid Res, 88: 6 531—6 535

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) AND GENETIC DIVERSITY OF CHINESE STURGEON (*ACIPENSER SINENSIS*)

ZHANG Si-ming, DENG Huai, YAN Yong, WANG Deng-Qiang, WU Qing-Jiang[†]

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou, 434000)

[†](Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

Abstract Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), regarding as an "living fossil", has a high value not only in science but also in commerce. However, due to habitat destruction, overfishing and pollution etc. the resources abundance has been depleting. In order to monitor the change in resources and develop a sound management program studies on population structure and gene diversity is necessary. Our previous investigation using protein electrophoresis showed that genetic diversity of Chinese sturgeon at protein level was poor. In order to further address the genetic variability Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to screen nuclear genome variation of natural population in Chinese sturgeon from the Yangtze River.

Totally 70 samples were analyzed by RAPD, and among the 70 samples 40, 17, and 13 samples were collected from year 1995, 1996, and 1997, respectively. 40 decamer primers were applied for analysis and only 26 primer gave stable result. Among 26 primers studied only 6 primers (23%) such as OPK01, OPK02, OPK03, OPK09, OPK14 and OPQ08 produced polymorphic bands. Total 108 bands (locus) were obtained by using 26 primers. A Primer Produced 4.2 bands on average. Out of the 108 bands (locus), 12 bands are polymorphic and percentage of polymorphic loci (P) was about 11.1%. Genetic distance between individuals is 0.974 3 on average, ranging from 0.951 0 to 1.000 0. The genetic diversity $H = - \sum \pi_i \ln \pi_i / N$ which was derived from Shannon's index of phenotypic diversity $H_o = - \sum \pi_i \ln \pi_i$ were introduced. Total genetic diversity from three year-pooled samples was 0.033 4. The genetic diversity for year 1995, 1996 and 1997 were 0.032 7, 0.031 2 and 0.035 4, respectively. Comparatively, the nuclear genome variability is poor, consistent with the data obtained from protein electrophoresis. The low genetic variability at nuclear level might take place a long time ago. The construction of the Gezhouba dam on the Yangtze River is not a reason for low genetic variation at nuclear genome because the individuals studied were born before the damming.

Key words Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) RAPD Genetic structure Genetic diversity Genetic conservation

Subject classification number Q347