

唐鱼野生与养殖群体遗传多样性的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析*

舒 琥^{1,2}, 蒙子宁¹, 易祖盛², 张 勇¹, 刘晓春¹, 林浩然¹

(1 中山大学水生经济动物研究所 // 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2 广州大学生命科学学院, 广东 广州 510405)

摘 要:应用随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 技术对唐鱼野生与养殖群体的遗传多样性进行了分析。从 40 个 10bp 引物中选取 15 个用于群体遗传多样性分析, 共检测出 93 个位点, 其中 46 个 (49.46%) 呈多态; 两群体的多态位点比例分别为 43.01% 和 41.94%; 用香农指数量化的遗传多样性指数, 野生群体 (0.23) 略高于养殖群体 (0.20), 平均遗传多样性指数为 0.22。群体内和群体间的遗传变异比例分别为 85% 和 15%; 群体的遗传相似度高达 0.96。彼此间的遗传距离仅为 0.04。研究表明, 唐鱼目前的种质资源状况令人堪忧, 恢复唐鱼有效种群大小、丰富物种遗传多样性是资源保护的基础。

关键词:唐鱼; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: Q 75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 01-0077-05

唐鱼 *Tanichthys albonubes* Lin 为我国特有的热带鱼类, 隶属鲤形目 *Cypriniformes* 鲤科 *Cyprinidae* 鲴亚科 *Danjoninae*。唐鱼属 *Tanichthys* 有白云山鱼、红尾鱼和金丝鱼等俗称。作为一种著名的观赏鱼类, 唐鱼在香港、东南亚、北美、西欧、非洲等国家和地区均有饲养。野生群体据记载原分布于我国广州白云山和东、北江小溪流狭小区域^[1], 近代人类活动使分布区的生态环境发生了很大变化, 加上该物种本身种群小、繁殖能力弱, 在自然界中罕见踪迹。1998 年版的《中国濒危动物红皮书》标明唐鱼的濒危等级为绝迹, 同年颁布的《野生动物保护法》将其列为国家二级保护动物^[2]。

目前唐鱼的研究大多集中在养殖、胚胎发育、亲缘关系等方面, 涉及遗传多样性的研究尚未见报道^[3-5]。现代遗传学观点认为, 一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件^[6]。因此, 研究物种的遗传结构和遗传分化, 揭示其遗传多样性水平是生物资源恢复和持续利用的前提和基础。

2003 年唐鱼野生群体再发现为研究该物种种质资源和保护利用提供了一个很好的契机^[7]。本文利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 对唐鱼野生和养殖群体的遗传多样性进行比较分析, 研究其遗传

背景, 以期为唐鱼的资源保护和管理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

唐鱼野生群体采自广州从化, 养殖群体购自广州芳村花鸟市场。每群体各 18 尾, 在 -180℃液氮罐中保存, 运回实验室后转入 -80℃超低温冰箱备用。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取参照 Sambroo (1989) 的方法^[8]。PCR 反应总体积为 25 μL, 包括: 10×Taq Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP (MBI) 1 μL, 5 μmol/L 引物 (上海博亚) 1 μL, 5 U Taq DNA 聚合酶 (MBI) 0.2 μL, 以及 10 ng μL 基因组 DNA 2 μL, 其余用超纯水补足。反应在 PTC-100 扩增仪上经 95℃预变性 5 min 后经过 45 个循环, 每个循环包括 94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 最后 72℃延伸 10 min。RAPD 产物用含有溴化乙锭的 w=1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 于 Bio-RAD Gel Doc 2000 自动成像仪上观察。

1.3 数据分析

电泳图谱中的每一条带记为一个位点, 只记录

* 收稿日期: 2005-04-20

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (C20308); 教育部科学技术研究重点资助项目 (02150)

作者简介: 舒琥 (1965 年生), 男, 副教授, 博士; 通讯联系人: 林浩然; E-mail: ls32@zsu.edu.cn

那些电泳后可辨认的条带，当某一扩增带出现时记为 1，缺失则记为 0，从而建立原始谱带矩阵，并据此统计位点总数、多态位点数和每个多态位点在群体中的分布频率。

群体的多态位点 P = 该群体的多态位点数 / 位点总数 $\times 100\%$

参考 Wachira (1995) 的公式^[9]，用香农指数来量化各群体的遗传多样性 H_0 ，平均群体内的遗传多样性 H_{pop} ，以及所研究的种类 n 个群体的遗传多样性总量 H_{sp} ，计算公式如下：

$H_0 = -\sum X_i \ln X_i$ (X_i 为位点 i 在某一群体中的出现频率)；

$H_{pop} = \sum H_0 / n$ (n 为所研究的群体数)；

$H_{sp} = -\sum X \ln X / N$ (X 为群体的综合表型频率， N 为位点总数)；

以 H_{pop} 、 H_{sp} 和 $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 分别计算和比

较遗传多样性在群体内和群体间的分布。利用 POPGENE1.32 软件计算群体间的遗传相似度 F 和遗传距离 D ^[10]。

2 结 果

实验选取 40 个随机引物 (BA0360 ~ BA0400) 中的 15 个产生稳定的扩增结果用于唐鱼野生和养殖群体的遗传多样性分析，共检测出 93 个位点，呈多态的有 46 个 (49.46%)。每个引物均能检测到多态位点 (1~5 个)，多态位点百分率 (20% ~ 83.3%) 因引物而异。野生群体在 40 个位点上呈多态，多态位点比例达 43.01%；养殖群体则存在 39 个多态位点，多态位点比例为 41.94% (表 1)。图 1 列举了引物 BA0367 对所有个体扩增产物的电泳图谱。

表 1 选取的 15 种随机引物扩增产物的数量
Tab. 1 Number of amplification products generated with 15 arbitrary primers

引物引物	序列 (5' ~ 3')	总位点数	变异位点总数	扩增产物变异位点数		检测的多态百分率
				野生群体	养殖群体	
BA 0367	AGCGAGCAAG	6	2	1	1	33.3
BA 0368	GAACA CTGGG	7	3	3	3	42.9
BA 0370	GTGCAACGTG	6	3	2	3	50.0
BA 0372	TGG CCCTCA C	5	1	1	0	20.0
BA 0373	GGTGTACCC	7	4	4	2	57.1
BA 0374	CCCGCTACAC	5	3	3	3	60.0
BA 0377	CCCAG CTG TG	4	2	2	2	50.0
BA 0388	AGCAGGTGGA	5	3	3	3	60.0
BA 0391	ACGATGAGCC	6	4	3	4	66.7
BA 0393	ACCG CCTGCT	7	3	3	2	42.9
BA 0394	GTGACAGG CT	6	5	5	5	83.3
BA 0396	AGG TTGCAGG	9	5	4	5	55.6
BA 0397	AGCCTGAGCC	6	4	4	4	66.7
BA 0398	ACCACCCACC	8	2	2	1	25.0
BA 0399	GAG TGCTGA C	6	2	0	1	33.3
合计		93	46	40	39	
多态比例 %			49.46%	43.01%	41.94%	



图 1 引物 BA0367 对唐鱼野生和养殖群体 RAPD 图谱
Fig. 1 RAPD profile of wild and cultivated population of *T. albanubes* with primer BA0367
M: DL2000 野生群体: 1~18, 养殖群体: 19~36, C: 空白对照
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 由 Shannon 多样性指数估计的遗传多样性在唐鱼群体内和群体间的分布

Tab. 2 Partition of the genetic diversity within and among populations of *Tetraodon lineatus* estimated by Shannon index

引物	H_0		H_{POP}	H_{SP}	$H_{POP} H_{SP}$	$(H_{SP}-H_{POP}) H_{SP}$
	野生群体	养殖群体				
BA0367	0.02	0.02	0.02	0.02	0.87	0.13
BA0368	0.29	0.27	0.28	0.28	0.98	0.02
BA0370	0.14	0.28	0.21	0.24	0.89	0.11
BA0372	0.10	0.00	0.05	0.06	0.78	0.22
BA0373	0.33	0.16	0.24	0.27	0.90	0.10
BA0374	0.33	0.20	0.26	0.28	0.93	0.07
BA0377	0.27	0.32	0.30	0.30	0.99	0.01
BA0388	0.40	0.36	0.38	0.41	0.94	0.06
BA0391	0.25	0.40	0.33	0.35	0.92	0.08
BA0393	0.16	0.06	0.11	0.13	0.88	0.12
BA0394	0.46	0.38	0.42	0.46	0.92	0.08
BA0396	0.26	0.31	0.28	0.30	0.96	0.04
BA0397	0.28	0.20	0.24	0.27	0.89	0.11
BA0398	0.17	0.04	0.10	0.14	0.74	0.26
BA0399	0.00	0.07	0.04	0.16	0.22	0.78
均值	0.23	0.20	0.22	0.24	0.85	0.15

利用 Shannon 多样性指数对 15 个引物所检测到的表型频率进行遗传多样性分析（表 2），野生群体的遗传多样性（ H_0 ）为 0.23，高于养殖群体的 0.20。两群体平均遗传多样性（ H_{pop} ）为 0.22，遗传多样性总量（ H_{sp} ）为 0.24。由 H_{pop}/H_{sp} 比值可见，引物 BA0377 和 BA0399 分别检测出群体内的最大和最小遗传变异（ H_{pop}/H_{sp} 分别为 0.99 和 0.22），群体内的遗传变异 H_{pop}/H_{sp} 均值为 0.85，而群体间的遗传变异（ $H_{sp}-H_{pop}$ ）/ H_{sp} 平均为 0.15。

结果显示，唐鱼两群体的遗传距离为 0.04，彼此间的遗传相似度为 0.96。

3 讨论

分析比较野生和养殖群体的遗传多样性对于反映人类活动对鱼类基因库的影响程度具有重要的参考价值。随机扩增多态 DNA（RAPD）技术具有快速、灵敏、简便等特点，已被广泛应用于遗传多样性检测以及品系鉴定等方面^[11-13]。本文利用 RAPD 技术对唐鱼野生和养殖群体的遗传多样性进行了研究，15 个随机引物共检测到 93 个位点，其中多态位点 46 个，多态位点百分率达 49.46%，

这充分说明了 RAPD 检测方法的灵敏性。对于类似研究，已有报道在稀有鮡鲫 *Gobiocypris rarus*^[14]、梭鱼 *Liza haematocheila*^[15]、真鲷 *Pagrus major*^[16]、牙鲆 *Paralichthys olivaceus*^[17]、鮟鲇状黄姑鱼 *Nibea mitchioies*^[18] 等鱼类以及其它水生生物（如对虾、贝类等）^[19, 20] 野生与养殖群体的 RAPD 分析。

通过横向比较 RAPD 检测到的稀有鮡鲫、梭鱼等其他鱼类的多态位点比例，得出它们的遗传多样性：梭鱼 > 真鲷 > 稀有鮡鲫 ≈ 唐鱼 > 牙鲆 > 鮟鲇状黄姑鱼。孟宪红等认为真鲷较高的遗传变异度与真鲷生命周期较长、野生群体年龄组成复杂有关；唐鱼与稀有鮡鲫均属分布区较窄、生境狭小的低等鲤科鱼类，遗传多样性相似；牙鲆较低的遗传多样性水平可能是因其为冷水性底层鱼类，洄游距离短，不同地理群体难以远交（outbreeding）之故。此外，作者在研究小黄鱼遗传多样性时也发现小黄鱼较高的多态位点比例可能与小黄鱼的广分布性及其栖息地多样性有关^[21]。综上所述，不同鱼类遗传多样性的差异除物种内在特定遗传结构差异外，可能还与其分布环境、生活史等有关。除此之外，鱼类的遗传多样性大小还与该物种是否历经人工养殖或种苗放流增殖有关，这些过程往往会因奠基者效应

(founder effect)、遗传漂变 (genetic drift) 和近交 (inbreeding) 等因素而造成种群遗传多样性降低^[22-23]，在以上用于比较的鱼类中，梭鱼的遗传多样性最高，鮠状黄姑鱼最低就是最直接的例证。

表 3 用 RAPD 方法研究不同鱼类的多态位点百分率的结果比较

Tab. 3 Comparison of percentage of polymorphic loci (P) among different fish species by RAPD study

种名	多态位点百分率 %		参考文献
	野生群体	养殖群体	
唐鱼	43.01	41.94	本研究
稀有鮡鲫	45.8~50	6.47	王剑伟, 等
梭鱼	85.71	83.93	权洁霞, 等 ^[15]
真鲷	62.6	54.47	孟宪红, 等 ^[16]
牙鲆	43.2	34.9	You Feng et al ^[17]
鮠状黄姑鱼	16.5	15.7	丁少雄, 等 ^[18]

遗传变异有一定的大小和分布格局，种内遗传变异可以分为群体内和群体间的变异，保持这两种变异可以最大限度地降低地理群体的灭绝几率，维持物种的稳定^[24]。本文对这两种变异进行了分析，从遗传多样性的分布可见，有 85% 的遗传变异源于群体内，15% 源于群体间。张四明等（2001）用 Shannon 多样性指数对与唐鱼同属于鲤科鱼类的长江水系的鲢鱼 *Hypophthalmichthys molitrix* 和草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 4 个地理群体的 RAPD 资料分析表明，鲢鱼 87.7% 的遗传多样性来源于群体内，12.3% 来源于群体间，群体间的遗传分化很小；草鱼 82.5% 的遗传多样性来源于群体内，群体间的遗传分化略高于鲢，为 17.5%^[25]。另一方面，塘鱼群体间的遗传相似度高达 0.96 而遗传距离仅为 0.03。因此，根据塘鱼遗传多样性的分布以及群体间的遗传相似度和遗传距离不难看出，塘鱼野生群体与养殖群体属于亲缘关系很近的两个不同的地理群体。

从遗传学角度，一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。遗传多样性的降低可导致其适应能力降低、有害隐性基因表达增加及经济性状衰退，最终导致物种退化。丰富的遗传多样性则意味着比较高的适应生存能力，蕴涵着比较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良能力。本研究中，塘鱼养殖种群的多态位点比例和香农多样性指数（41.94%，0.20）只略低于野生群体（43.01%，0.23），似乎养殖群体的遗传多样性并没有显著降低。造成这种结果的可能原因是：人工养殖过程对塘鱼的遗传多样性、种质资源并没有造成明显影响；人类活动影响唐鱼

的生存环境，造成塘鱼生境破碎化，导致近亲繁殖，影响塘鱼的遗传多样性；这个有趣的问题还有待于深入研究。但值得指出的是，塘鱼野生群体近 20 a 罕见踪迹，濒于灭绝。种群生态学认为，种群数量的急剧下降使种群历经一个瓶颈 (bottleneck)，大大降低残留种群和未来种群的遗传多样性。因此，我们有理由认为目前唐鱼的种质资源状况令人堪忧，在这个具有较高观赏价值的珍稀物种尚未出现如受精率下降或对环境变化的适应力下降等近交衰退特征时，应大力开展唐鱼种质资源研究，加强对现有资源的科学管理和保护；恢复唐鱼有效种群大小 (effective population size)、丰富物种遗传多样性是资源保护的基础。

参考文献:

[1] 中国水产科学研究院珠江水产研究所等. 广东淡水鱼类志 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1991: 78

[2] 汪松, 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书 [M]. 北京: 科技出版社, 1998: 68

[3] 梁健宏, 连常平, 刘汉生, 等. 唐鱼全人工繁育试验 [J]. 水利渔业, 2003, 23(6): 30-31.

[4] 陈国柱, 方展强, 马广智, 等. 唐鱼胚胎发育观察 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 489-496

[5] 何舜平, 陈宜瑜, NAKAJIMA T. 东亚低等鲤科鱼类细胞色素 b 基因序列测定及系统发育 [J]. 科学通报, 2000, 45(21): 2297-2302

[6] CONRAD M. Adaptability: the Significance of Variability from Molecular to Ecosystem [J]. New York: Plenum Press, 1983

[7] 易祖盛, 陈湘舜, 巫锦雄, 等. 野生唐鱼在广东的再发现 [J]. 动物学研究, 2004, 25(6): 551-555

[8] SAMBROOK J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[9] 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

[10] NEIM, LIW H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of National Academy Science U. S. A, 1979, 74: 5267-5273

[11] WILLIAMS J K G, KUBELIK A R, LIVAK K J et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531-6535

[12] DNESH K R, LIM T M, CHUA K L, et al. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes [J]. Zoological Science, 1993, 10: 849-854

[13] BARDAKCI E, SKIBINSKI D O F. Application of the

RAPD technique in tilapia fish species and subspecies identification[J]. Heredity 1994 73: 117 – 123

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

[15] 孟宪红, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000 8(3): 248 – 252

[16] 权洁霞, 戴继勋, 沈颂东, 等. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD) 分析[J]. 海洋学报, 2000 22(5): 82 – 87.

[17] YOU F XIANG J H SONG L S et al Genetic variations in natural and cultured stocks of Shandong Paralichthys Olivaceus(T. &S) as revealed by RAPD [J]. Studia Marina Sinica 2002 44: 228 – 234

[18] 丁少雄, 苏永全, 王军, 等. 闽粤沿海鮟状黄姑鱼野生种群和人工繁育群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2003 27(8): 63 – 66

[19] 庄志猛, 孔杰, 石拓, 等. 日本对虾野生和养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 自然科学进展, 2001 11(3): 250 – 255.

[20] 宋林生, 李俊强, 李红蕾, 等. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与养殖群体的遗传结构及其遗传分化的研究[J]. 高科技通讯, 2002 83 – 86

[21] 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 2003 11(3): 197 – 203

[22] KIRSTEN W, JENNY P V. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum using random primers[J]. Heredity 1993 71: 335 – 341

[23] W ELSH J MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research 1990 18: 7213 7218

[24] HEDRICK P W, MILLER P S. Conservation genetics techniques and fundamentals [J]. Ecological Applications 1992 2: 30 – 46

[25] 张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究[J]. 水生生物学报, 2001 25(4): 324 – 330

The Genetic Diversity of Wild and Cultivated Population of *Tan ichthys albonubes* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Method

SHU Hu^{1, 2}, MENG Z i ning¹, YI Zuo sheng², ZHANG Yong¹, LIU X iao chun¹, LIN Hao ran¹

(1. Institute of Aquatic Economic Animal and Key Lab of Guangdong for Improved Variety Reproduction of Aquatic Economic Animals, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China
2. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to analyze the genetic diversity between wild population and cultivated population of *Tan ichthys albonubes*. Using 15 out of 40 decamer random primers, a total of 93 RAPD loci were detected, of which 46 loci (49. 46%) were polymorphic. The proportion of polymorphic loci of two populations was 43. 01% and 41. 94%, respectively. Genetic diversity quantified by Shannon index of wild population (0. 23) is slightly higher than cultured population (0. 20) with an average of 1. 93. Partition of genetic variability indicated that 85% was distributed within and 15% among populations. The genetic similarity between populations was high up to 0. 96 and genetic distance was just 0. 04. Results of RAPD analysis suggested the germplasm resource of *T. albonubes* is in the poor condition, and it's essential for resource protection to recover effective population size and enrich species genetic diversity.

Key words *Tan ichthys albonubes*; genetic diversity; RAPD