

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0307 - 06

## 青海湖裸鲤繁殖群体遗传多样性的 RAPD 分析

张春霖<sup>1,3</sup>, 陈大庆<sup>2,3,4</sup>, 史健全<sup>5</sup>, 祁洪芳<sup>5</sup>, 鲁成<sup>6</sup>

(1. 西南农业大学水产学院, 重庆 北碚 400716;

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, 湖北 武汉 430072;

3. 中国水产科学研究院长江水产研究所农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 湖北 荆州 434000;

4. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

5. 青海省鱼类原种良种场, 青海 西宁 810016; 6. 西南农业大学农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 北碚 400716)

**摘要:**采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 方法对青海湖裸鲤的 3 个洄游繁殖群体 - 黑马河 (HM)、布哈河 (BH) 及沙柳河 (SL) 群体各 30 个个体的 DNA 多态性进行了分析。用 13 个引物在三个群体中共检测出 85 个位点, 其中多态性位点 68 个。青海湖裸鲤群体总的 DNA 多态位点百分率为 80.0%。数据分析结果显示:青海湖裸鲤 3 个群体总的 Nei 基因多样性为 0.3395, Shannon 遗传多样性信息指数为 0.4861, 存在着较为丰富的遗传多样性。青海湖裸鲤 3 个群体间平均遗传距离为 0.0788, 基因分化系数  $G_{st}$  为 0.1070, 表明 3 个繁殖群体间产生了一定程度的遗传分化, 通过 UPGMA 方法进行聚类分析显示, HM 群体和 BH 群体优先聚类, 表示它们之间的基因交流程度要高于它们分别与 SL 群体之间的交流。

**关键词:**青海湖裸鲤; DNA 多态性; 遗传多样性; 遗传分化; 基因交流

**中图分类号:** Q347; S917 **文献标识码:** A

## Genetic diversity analysis of different populations of *Gymnocypris przewalskii* by RAPD

ZHANG Chun-lin<sup>1,3</sup>, CHEN Da-qing<sup>2,3,4</sup>, SHI Jian-quan<sup>5</sup>, QI Hong-fang<sup>5</sup>, LU Cheng<sup>6</sup>

(1. Fisheries College, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

4. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

5. Qinghai Provincial Fish Farm of Fine Breeds, Xining 810016, China;

6. Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** DNA polymorphism of thirty individuals of each of the three migrating reproductive populations of *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) in the Qinghai Lake was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD), which were Heimaha population (HM), Buhaha population (BH) and Shaliuhe population (SL). A total of 85 loci, including 68 polymorphic ones, were detected from the three populations by using 13 primers. The average percentage of polymorphic loci to total DNA of the three populations was 80.0%. The results of data analysis showed that the populations had on average the Nei's value of 0.3395 for gene diversity and the Shannon's information index of 0.4861, there existing a relatively abundant genetic diversity. The average genetic distance among the three populations was 0.0788. The gene differentiation coefficient ( $G_{st}$ ) of 0.1070 indicated that there was genetic differentiation of a certain degree among the three populations. Clustering analysis by UPGMA method showed that HM and BH were clustered with

收稿日期: 2004-04-12

资助项目: 青海省科技厅“十五”攻关项目(2001 - N - 122); 淡水生态与生物技术国家重点实验室项目(2003FB02)

作者简介: 张春霖(1971 - ), 男, 贵州榕江人, 博士研究生, 主要从事鱼类分子生物学研究

通讯作者: 陈大庆, Tel: 0716 - 8212277 - 3046, E-mail: chdq@yfi.ac.cn

priority, indicating that the gene flow of both populations was more frequent than that between either and SL.

**Key words:** *Gymnocypris przewalskii*; DNA polymorphism; genetic diversity; genetic differentiation; gene flow

青海湖裸鲤 *Gymnocypris przewalskii* (Kessler), 生活在青海湖及其附属水系中, 属鲤形目, 鲤科, 裂腹鱼亚科、裸鲤属, 是青海湖中唯一的经济鱼类, 于 1976 年经国务院批准为我国重要名贵水生动物。已有研究显示, 无论是形态特征、蛋白质、基因组, 还是 mtDNA, 青海湖裸鲤都具有丰富的遗传多样性<sup>[1-6]</sup>, 反映青海湖裸鲤这种高原鱼类特殊的生命进化历程和适应高原复杂环境的能力。目前, 青海湖裸鲤的种群正处于剧烈衰退之中, 影响了整个青海湖地区的生态平衡<sup>[7]</sup>。但是如何恢复其种群数量, 怎样合理地进行种群数量的补充, 特别是在不影响其自然的遗传性状和群体遗传多样性的前提下实现该种群的增长和恢复。这就需要深入对其遗传多样性和各个自然群体之间遗传关系进行研究和分析, 以制定一个建立在科学的理论依据之上的种群保护和人工放流措施。本文通过对不同水系繁殖群体遗传多样性分析, 以期对青海湖裸鲤种群的增长和恢复提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用材料于 2002 年 7 月青海湖裸鲤溯河繁殖期间, 分别采集于黑马河、布哈河以及沙柳河, 每条河流各采集 30 尾。取肌肉 3~5 g 于无水乙醇中浸泡保存。

### 1.2 DNA 的提取和模板置备

取 0.1 g 左右肌肉采用常规方法提取基因组总 DNA, TE 溶解至 500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  备用。

### 1.3 RAPD 扩增

RAPD 随机引物为 Operon Technologies 生产的 10 碱基随机引物。反应体系为: 反应体积 20  $\mu\text{L}$ , 含模板 DNA 约 100 ng、随机引物 1.25 mmol  $\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTP 2.5 mmol  $\cdot\text{L}^{-1}$ 、TaqDNA 聚合酶 0.4 U、2  $\mu\text{L}$  10  $\times$ Buffer、MgCl<sub>2</sub> 2.5 mmol  $\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应循环为: 94 变性 1 min、37 退火 1 min、72 延伸 1.5 min, 共 40 个循环, 最后 72 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。最后经溴化乙锭染色 15 min 在 Gel 2000 凝胶成像系统成像。

## 1.4 数据处理

统计电泳后凝胶上清晰可见的扩增条带, 对于不同个体所扩增出的 RAPD 带, 只要迁移率相同都视为显性赋值为“1”, 缺乏此带视为隐性赋值为“0”, 将结果转换成二元数据矩阵, 输入计算机 Popgen3.2 软件中, 统计相应结果。

### 遗传多样性指标

(1) 多态位点百分率  $P$ :  $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$

(2) Nei 氏基因多样性指数  $h$

(3) Shannon 信息指数  $I$

(4) 群体平均杂合度  $H$ :  $H = (1 - \sum P_i^2) / n$

其中  $P_i$  为第  $i$  个位点的频率

### 遗传变异指标

(1) Nei 氏遗传相似指数  $F$ :  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$

其中  $N_{xy}$  代表 X, Y 两个个体共有的扩增带,  $N_x$ 、 $N_y$  是 X 与 Y 个体各自所有的扩增带。

(2) Nei 氏遗传距离  $D$ :  $D = 1 - F$

(3) 遗传分化指数  $G_{st}$ :  $G_{st} = (H_T - H_{pop}) / H_T$   
其中  $H_T$  为总群体的平均多样性,  $H_{pop}$  为各群体多样性的平均值。

(4) 基因流  $Nm$ :  $Nm = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组随机扩增多态性 DNA (RAPD) 结果

本研究共筛选了 30 种随机引物, 其中 13 种引物可产生清晰、可重复的扩增带。用这 13 种引物 (*kitC02*, *kitC10*, *kitV1*, *kitV2*, *kitV6*, *kitV7*, *kitV9*, *kitV14*, *kitQ5*, *kitR10*, *kitN3*, *kitZ8*, *kitZ12*,) 对青海湖裸鲤的 3 个群体共 90 尾个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 对清晰的可计数位点进行统计 (其中引物 *kitC10* 和 *kitC02* 对黑马河裸鲤 1~23 号个体进行扩增的电泳图谱分别见图 1, 图 2)。它们都能产生具有群体或者个体特异性的数量不同的带型, 各引物在 3 个群体中所产生的位点数见表 1。

13 种引物共检测到 85 个可记数的信息位点, 多态位点 68 个, 占 80.0% (表 1)。每个引物产生 3~11 个位点, 各引物检测到的信息位点数

差异较大,平均每个引物可产生 6.54 个信息位点。青海湖裸鲤群体多态位点比例在 67.06% ~ 72.94% 之间,多态位点比例高的为布哈河(BH)

群体(73.49%)和黑马河(HM)群体(72.94%),沙柳河(SL)群体的多态性位点比例较低(71.25%)。

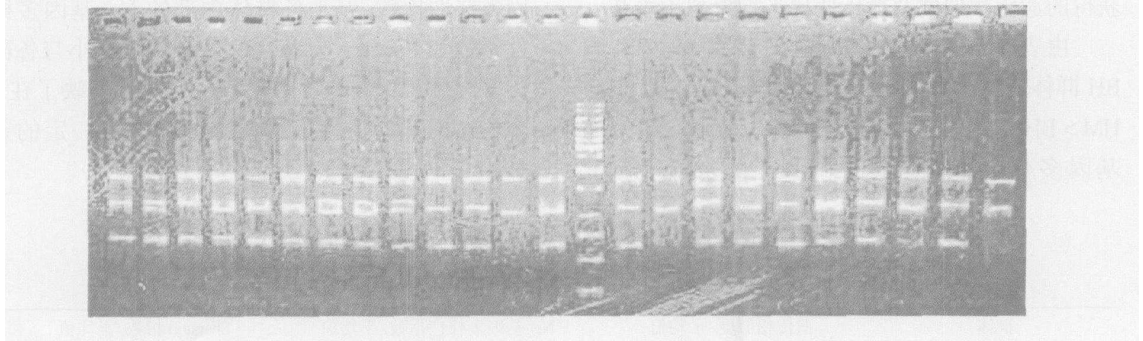


图 1 引物 *kitC10* 对黑马河裸鲤 1~23 号个体的扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of RAPD products of HM population with primer *kitC10*

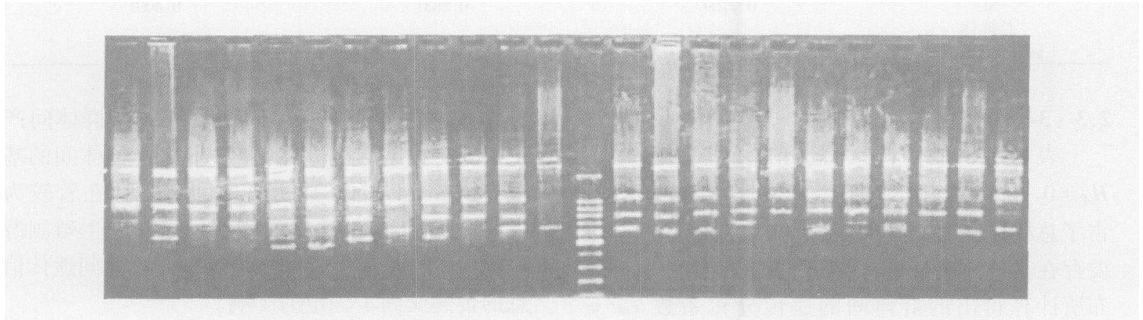


图 2 引物 *kitC02* 对黑马河裸鲤 1~23 号个体的扩增产物电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of RAPD products of HM population with primer *kitC02*

表 1 13 种引物在 3 个群体中扩增产生的位点数

Tab. 1 Sites of RAPD products with 13 primers in three populations

引物 primer	黑马河群体 HM population		布哈河群体 BH population		沙柳河群体 SL population		总群体 total population	
	位点数 loci	多态位点数 polymorphic loci	位点数 loci	多态位点数 polymorphic loci	位点数 loci	多态位点数 polymorphic loci	位点数 loci	多态位点数 polymorphic loci
<i>kitC02</i>	7	4	7	4	7	5	7	5
<i>kitV14</i>	7	5	7	4	7	4	7	5
<i>kitV07</i>	4	1	4	2	4	0	4	2
<i>kitR10</i>	6	5	5	4	5	4	6	5
<i>kitV01</i>	3	2	3	2	2	1	3	3
<i>kitN03</i>	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>kitZ12</i>	4	3	4	4	4	4	4	4
<i>kitV02</i>	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>kitV06</i>	10	6	10	6	9	6	10	7
<i>kitV09</i>	10	9	9	8	9	8	10	9
<i>kitZ08</i>	11	8	11	8	11	8	11	8
<i>kitC10</i>	5	2	5	2	5	1	5	3
<i>kitQ05</i>	8	7	8	7	7	6	8	7
合计 total	85	62	83	61	80	57	85	68
多态位点 比例(%) percent of polymorphic loci		72.94		73.49		71.25		80.00

2.2 青海湖裸鲤各群体内的遗传变异分析

比较 3 个群体内任意两个个体的 RAPD 结果计算出各群体中的两个个体间的遗传相似度, 所获得的遗传相似度及遗传变异平均值列于表 2。

由表 2 的数据显示, 青海湖裸鲤 SL、HM 和 BH 群体内的遗传相似度由高到低依次为: SL > HM > BH, 遗传变异度则相反 BH > HM > SL。Nei 基因多样性指数分别为 BH = 0.3248、HM =

0.3002、SL = 0.2831, Shannon 多态性信息指数分别为 BH = 0.4638、HM = 0.4346、SL = 0.4081。虽然 Shannon 多态性信息指数的数值要高于 Nei 基因多样性指数, 但是各群体内部的 Nei 基因多样性指数和 Shannon 多态性信息指数的大小与各群体多态位点比例的大小趋势一致。这反映了在 3 个群体内部的遗传多样性之间存在着一定的差异。

表 2 青海湖裸鲤各群体遗传相似度与基因多样性指数

Tab. 2 Genetic similarity and gene variety in each populations of *Gymnocypris przewalskii*

群体 population	遗传相似度/ 平均值 genetic similarity/ mean	Nei 基因多样性指数/ 平均值 Nei gene variety index/ mean	Shannon 指数/ 平均值 Shannon index/ mean
BH	0.6752	0.3248	0.4638
HM	0.6998	0.3002	0.4346
SL	0.7169	0.2831	0.4081
总群体 total population	0.6605	0.3395	0.4861

2.3 3 个群体间的遗传分化

表 3 结果显示: 青海湖裸鲤总基因多样性  $H_T = 0.3395$ , 各群体内基因多样性  $H_S = 0.3027$ , 占了总群体基因变异的 89.2%, 表明遗传变异主要存在于群体内。另外, 根据基因多样性水平分布所计算得出的群体间的遗传分化系数  $G_{ST} =$

0.1084, 表明青海湖裸鲤 3 个洄游繁殖群体间产生了一定程度的遗传分化, 另外, 3 个群体间的基因流  $N_m = 4.1114$ , 显示群体间还是存在着较为广泛的基因交流, 这就说明在每一次的生殖洄游过程中所产生的地理隔离导致不同群体间遗传信息的传递受到了一定的影响。

表 3 青海湖裸鲤群体间的遗传分化与基因流

Tab. 3 Genetic diversity and gene flow between populations of *Gymnocypris przewalskii*

	总基因多样性 $H_T$	群体内基因多样 $H_S$	遗传分化系数 $G_{ST}$	基因流 $N_m$
平均 mean	0.3395	0.3027	0.1084	4.1114
标准差 SD	0.0392	0.0333		

青海湖裸鲤 3 个洄游群体间的遗传变异程度通过 Nei 遗传距离计算得出(表 4): 黑马河群体与布哈河群体之间遗传距离最小(0.0557), 黑马河群体与沙柳河群体之间遗传距离最大(0.1002), 这反映了它们之间存在着不同的基因交流水平。平均遗传距离为 0.0788, 说明三个群体间还是出现了较弱的遗传分化。

表 4 青海湖裸鲤群体间的遗传相似性和遗传距离

Tab. 4 Genetic similarity and distance between populations of *Gymnocypris przewalskii*

	HM	BH	SL
HM		0.9458	0.9047
BH	0.0557		0.9132
SL	0.1002	0.0908	

根据遗传距离进行 UPMG 聚类分析结果如图 3 所示, 显示了这 3 个群体遗传相互作用、影响程度的大小, 其中黑马河群体与布哈河群体间存在着更为广泛的遗传信息的相互渗透, 而沙柳河群体则较为难以与另外两个群体之间进行遗传信息的传递, 而形成较远的亲缘关系。

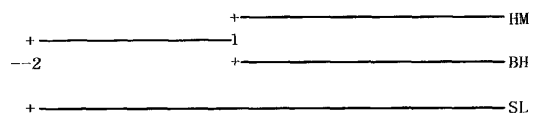


图 3 青海湖裸鲤 3 个群体的系统发育关系图

Fig. 3 Phylogenetic relationship of three populations of *Gymnocypris przewalskii*

### 3 讨论

#### 3.1 青海湖裸鲤的遗传多样性

遗传多样性的研究是生物多样性研究的重要内容,只有通过遗传多样性的研究才能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化。已有的研究显示了在形态特征、蛋白质、基因组以及 mtDNA 水平上,青海湖裸鲤都具有丰富的遗传多样性,反映了青海湖裸鲤这种高原鱼类特殊的生命进化历程和适应高原复杂环境的能力。

研究结果显示,青海湖裸鲤的总基因多样性  $H_T = 0.3395$ ,与黄颡鱼<sup>[8]</sup>、野生稀有鮡鲫<sup>[9]</sup>和鲢<sup>[10]</sup>的遗传多样性相当,而高于长江鱮<sup>[11]</sup>、褐首鲢<sup>[10]</sup>,说明该物种具有较高水平的遗传多样性和环境适应能力。现有的资料表明,物种在形成时所处的条件越不稳定,就越具广生性,它的形状和属性的变异幅度就越大。青海湖地区地处青藏高原,形成于第三纪末期开始的青藏高原的急剧隆升,在此过程中,由于环境条件发生显著改变,使原本生活于本地区温暖水域中原始鲃类鲃亚科(Barbinae)的某一类产生相应变化,随着地理或生境上的隔绝,逐步演化成适应高原寒冷环境的裂腹鱼类<sup>[12]</sup>。青海湖裸鲤环境的显著特点是气候寒冷,年均气温低(约 5.2℃)、冰冻期长(5 个月),湖水溶氧量与生物营养元素含量较低,可供的食料贫乏。也许正是在这种复杂不稳定环境中长期进化积累的结果,使青海湖裸鲤形成了丰富的遗传多样性。

#### 3.2 青海湖裸鲤繁殖群体之间的遗传差异

青海湖裸鲤繁殖群体内的平均基因多样性  $H_S = 0.3027$ ,占了总遗传变异的 89.2%,表明遗传变异主要存在于繁殖群体内,繁殖群体间的基因变异较弱。另外,布哈河群体的基因多样性水平最高,黑马河群体次之,沙柳河群体最低。这可能与洄游群体大小有一定关系,布哈河是青海湖最大的一条支流,每年溯河繁殖的裸鲤数量也是最大的。因而在洄游过程中有更大的可能把其它洄游群体的边缘个体卷入,从而发生更为广泛的基因交流,具有更高水平的基因多样性。而其它较小河流发生此类基因交流的机会较小,而具有较低水平的基因多样性。

王家玉<sup>[13]</sup>利用遗传相似指数  $I_N$  和遗传距离  $D$  值对物种的不同分类单位间的遗传分异水平作

过定量性估计,并指出种群间遗传距离  $D$  值的范围是 0 ~ 0.05;亚种间是 0.02 ~ 0.2。Shaklee 等<sup>[14]</sup>综合已发表的资料,提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离  $D$  值分别为 0.9,0.30 及 0.05 的分类判据。本实验统计结果表明,3 个群体间的遗传平均距离为 0.05 ~ 0.1 之间,表明它们之间的遗传分化达到了种群的分化标准。其中黑马河群体与布哈河群体间的平均遗传距离最小为 0.0511,布哈河群体与沙柳河群体次之为 0.0608,而黑马河群体与沙柳河群体的遗传距离最大为 0.0713,这反映出布哈河群体与黑马河群体间的基因流较沙柳河群体间的基因流大,这可能与 3 条河流间地理位置所产生的空间隔离有一定关系。青海湖裸鲤的群体分化程度与长江中游鲢的群体遗传变异程度相当,而高于草鱼<sup>[15]</sup>。与辽河水系、珠江水系、长江上游和长江中游高体鲫<sup>[16]</sup>的地理种群分化相比较,青海湖裸鲤群体分化程度也较高,而与天津天然水体中两个鲫鱼自然群体<sup>[17]</sup>的遗传分化程度( $D = 0.158$ )相比较则较低。

总的来看,青海湖裸鲤群体之间的遗传变异程度较小,分化程度不大。但是,考虑到这是在一个湖泊中的 3 个不同的生殖洄游群体间所产生的遗传分化,我们可以认为青海湖裸鲤已经建立起了一种相对稳定的生殖洄游模式,交配对象之间具有一定的相对稳定性。

#### 3.3 遗传多样性与青海湖裸鲤的资源保护

物种的濒危原因主要是栖息地破坏、污染、生境退化和生物资源的过度利用。遗传变异丰富的种群在环境变迁中有较大的适应能力,但是过度的开发利用所导致的遗传多样性的丧失将危机其自身的延续能力,加快物种的濒危。因此,有计划地开发利用青海湖裸鲤资源,或采取建立基因库的保护办法,是保持其进化潜力、适应不同生境以及可持续利用的前提。现在,青海湖每年都进行大量裸鲤人工增殖放流,但是人工增殖放流所有亲本均来自于沙柳河,随着时间的推移必将对青海湖裸鲤资源遗传结构产生影响。因此,在裸鲤人工增殖放流过程中,应采用多水系裸鲤亲本,同时加大对布哈河繁殖群体保护力度,监测各种资源恢复措施对青海湖裸鲤的遗传多样性所产生的影响,对种质资源的纯度和数量进行检验,只有这样才能有效保护和恢复青海湖裸鲤资源。

中国科学院水生生物研究所乔晔、谭细畅,西南农业大学唐红玉,华中农业大学熊飞,青海省鱼类原种良种场杨建新、苏霞等同志参加部分采样工作,谨表谢意。

#### 参考文献:

- [1] 朱松泉,武云飞. 青海湖地区的鱼类区系和青海湖裸鲤的生物学[M]. 北京:科学出版社,1975. 3 - 16.
- [2] 周虞灿. 青海湖裸鲤血清蛋白以及血红蛋白多态性的分析[J]. 高原生物学集刊, 1984, 2:125 - 131.
- [3] 祁得林,李军祥. 青海湖裸鲤血清过氧化物酶多态性初步研究[J]. 淡水渔业, 2002, 32(5): 57 - 58.
- [4] 张武学,张才骏,李军祥. 青海湖裸鲤乳酸脱氢同工酶的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1994, 24(3): 9 - 12.
- [5] 赵凯. 青海湖裸鲤与草鱼遗传变异性比较[J]. 淡水渔业, 2001, 31(2): 51 - 52.
- [6] 赵凯,李军祥,张亚平,等. 青海湖裸鲤 mtDNA 遗传多样性的初步研究[J]. 遗传, 2001, 23(5): 445 - 448.
- [7] 陈民琦,林建国,应百才. 青海湖封湖 3 年对裸鲤种群结构的影响. 青海师范大学学报(自然科学版)[J], 1990, 1: 50 - 56.
- [8] 宋平,潘云峰,向筑,等. 黄颡鱼 RAPD 标记及其遗传多样性分析[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2001, 47(2): 233 - 237.
- [9] 王剑伟,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.
- [10] 赵文学,孙玉华,邵雪琳,等. RAPD 技术对鮡和褐首鮡遗传多样性的研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2001, 47(6): 782 - 784.
- [11] 张德春. 鲮鱼人工繁殖群体遗传多样性的研究[J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2002, 24(4): 379 - 381.
- [12] 陈宜瑜,陈毅峰,刘焕章. 青藏高原动物地理区的地位和东部界限问题[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 98 - 103.
- [13] 王家玉(译). 分子群体遗传学与进化论[M]. 北京:农业出版社, 1975. 121 - 133.
- [14] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoresis analysis of proteins[J]. Pac Sci, 1982, 36: 141 - 157.
- [15] 郭武. 青海湖水位下降与湖区生态环境演变研究[J]. 干旱区资源与环境, 1997, 11(2): 75 - 80.
- [16] 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.
- [17] 易犁,王伟. 基于 RAPD 分析的高体鳊地理分化研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(3): 301 - 304.
- [18] 王晓梅,宋文芹,李秀兰,等. 鲫鱼种群的随机扩增多态 DNA 与遗传多态性分析[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 26 - 28.