

长臀 的 AFLP 分析

程 飞^{1,2} 谢松光² 叶 卫³ 叶富良¹

(1. 广东海洋大学, 湛江 524025; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 3. 广东罗非鱼良种场, 广州 511453)

摘要:采用 AFLP 分子标记技术对珠江长臀 和海南长臀 共 60 个个体(每个群体 30 个)进行了遗传多样性研究。选取的 18 对引物组合均能扩增出清晰、可重复的扩增产物, 扩增带型差异明显。两个群体均表现出较高的多态位点比例和特异性条带数。群体内个体间的遗传相似度(平均值)珠江长臀 种群为 0.9462 ± 0.0237 , 海南长臀 为 0.9465 ± 0.0226 , 海南长臀 比珠江长臀 略高。群体间的遗传相似度是 0.9367 ± 0.0231 , 小于两个群体内的遗传相似度, 两群体的遗传距离是 0.0634 ± 0.0230 。根据遗传相似度绘制了 UPGMA 聚类图。研究结果表明: 珠江长臀 和海南长臀 间的遗传差异属于种内差异, 两者同属一个有效种。

关键词:长臀 ; AFLP; 遗传多样性

中图分类号: Q346+.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0539-07

长臀 (*Cranoglanis boudierius*) 隶属于鲇形目 (Siluriformes) 长臀 科 (Cranoglanididae) 长臀 属 (*Cranoglanis*), 为东亚特有种, 俗称骨鱼, 是我国名贵经济鱼类。其主要分布于中国珠江水系、海南岛、云南的元江水系, 国外仅见于元江下游越南北部的红河水系^[1]。目前, 国内对长臀 的研究偏少, 多集中在养殖和基础生物学方面^[2]。长臀 的人工繁殖技术不成熟, 养殖长臀 主要依靠捕捞天然苗种, 天然群体资源日益枯竭, 已被列为易危物种^[3]。长臀 属鱼类的物种有效性存在较大争议^[1], 珠江长臀 和海南长臀 的物种有效性一直未能确定, 当前分类学家主要依据形态学性状区分珠江长臀 和海南长臀 。因此, 开展长臀 分子标记研究, 对其的分类、种质保护和合理利用具有重要意义。

扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 具有多态性强、稳定性好、重复性高等优点, 非常适用于遗传多态性分析、系统分类、物种分类和鉴定等研究, 是一种极有希望的 DNA 分子标记^[4]。本文利用 AFLP 技术对长臀 群体进行研究, 旨在为深入开展长臀 遗传研究提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 珠江长臀 30 尾采集于广东罗非鱼良种场, 海南长臀 30 尾采集于海南(南渡河)。实验鱼活体带回实验室, 取全血 1 mL ACD (acid-citrate-dextrose) 抗凝, -20°C 保存, 备用。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 应用 DNA 提取试剂盒 (TIANWEI) 提取基因组 DNA, 操作按试剂盒说明书进行。将得到的 DNA 溶于 TE 缓冲液中, 经琼脂糖凝胶电泳估测其浓度和纯度, 并调整 DNA 浓度至 $50\text{ng}/\mu\text{L}$, 4°C 保存备用。

1.2.2 双酶切 采用 *EcoR* I/*Mse* I 和 *Pst* I/*Taq* I 2 个限制性内切酶组合进行酶切。酶切反应总体积为 $20\mu\text{L}$, 其中包括: buffer $2\mu\text{L}$, BSA $2\mu\text{L}$, DNA, 限制性内切酶, 加水至 $20\mu\text{L}$; 连接反应总体积为 $20\mu\text{L}$, 其中包括 buffer $2\mu\text{L}$, 接头 $2\mu\text{L}$, 酶切产物 $10\mu\text{L}$, T4 连接酶 2U, 加水至 $20\mu\text{L}$ 。*E/M* 酶切反应条件是 37°C 、3h, 65°C 、15min 灭活酶; 连接反应条件是 37°C 、10h, 70°C 、10min 灭活酶, -20°C 保存。*P/T* 酶切反应条件是 *Taq* I, 65°C 、2h, 加 *Pst* I, 37°C 、2h, 80°C 、20min 灭活酶; 连接反应条件是 22°C 、5h, 70°C 、10min 灭活酶, -20°C 存。

收稿日期: 2007-09-30; 修订日期: 2008-12-11

基金项目: 广东省科技重大专项 (2005A20105001) 资助

作者简介: 程飞 (1977—), 男, 汉族, 湖北黄陂人; 硕士生; 主要研究方向为水产经济动物生物学及种苗工程。E-mail: gdoucf@163.com

通讯作者: 叶卫, E-mail: yeweil95856@tom.com

1.2.3 预扩增 直接取连接产物 1 μL 预扩增。反应总体积 20 μL , 包括: buffer 2 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL , 引物各 5 pmol, *Taq* 酶 1 U, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, 加水至 20 μL 。混匀后, 按如下 PCR 条件扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 共 25 个循环。预扩增结束后, 产物 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 选择性扩增 将预扩增产物稀释 20 倍进行选择选择性扩增, 取 1 μL 稀释后的预扩增混合液, 加入 19 μL 如下反应液, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL ; 引物各 5 pmol; *Taq* 酶 1 U; buffer 2 μL ; Mg^{2+} 1.5 mmol/L; 加水至 20 μL 。混匀后, 按如下 PCR 条件扩增, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 65 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 每个循环退火温度降 0.7 $^{\circ}\text{C}$, 共 12 个循环; 然后改为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 共 23 个循环。产物 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 产物电泳检测 6% 的聚丙烯酰胺凝胶结合银染法检测; 银染按许绍斌等^[5] 的快速银染法进行。

1.2.6 统计与分析 选取清晰的扩增片段进行数据统计。各样品在同一迁移位置出现扩增片段记为 1, 缺失的记为 0。多态片段比例 = (多态片段数量/检出片段总数) \times 100%; 个体间的遗传差异度或群体间的遗传距离 = $1 - S_{ij}$, 其中: 相似系数按 Lynch^[6] 的公式计算, 即: $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。式中 S_{ij} 为相似系数, N_{ij} 为个体 i 与 j 共有片段的数量, N_i 、 N_j 分别为个体或群体 i 与 j 各自具有片段的数量。

利用分析软件 NTSYSpc21 分析 AFLP 数据, 采用

非加权配对算术平均法 (Unweighted pair group method arithmetic averages, UPGMA) 进行聚类分析, 再进行 bootstrap 1000 次重复抽样验证可信度, 构建聚类图。

2 结果

2.1 扩增结果

本实验筛选了 *E/M* 和 *P/T* 两种酶切组合, 总共 146 个 AFLP 引物组合, 其中 18 对引物组合的 PCR 扩增产物重复性好且带型相对较为清晰, 多态性丰富 (图 1), 被选择用于分析, 包括 *E/M* 组合 8 对, *P/T* 组合 10 对 (表 1)。

8 对 *E/M* 选择性引物共检出了 453 条不同的扩增片段, 每对引物扩增出的片段数目为 45—66 条, 平均 56.63 条; 有 258 个座位是多态性的, 平均为 32.25 条, 多态性座位所占比例为 56.95%。10 对 *P/T* 选择性引物共检出了 481 条不同的扩增片段, 每对 *P/T* 引物扩增出的片段数目为 42—62 条, 平均 48.1 条; 有 231 个座位是多态性的, 平均为 23.1 条, 多态性座位所占比例为 48.02%。

在 18 对引物中, 以 *E-AAG/M-CTG* 引物对扩增出的片段最多 (64 条); *P-AAG/T-AAC* 和 *P-ACA/T-ATG* 引物对扩增出的片段最少 (38 条)。多态性条带数目最多的引物是 *E-AAC/M-CAC* (33 条), 最少的引物是 *P-ATT/T-ACA* (5 条), 其中多态片段的比例则以 *E-AAC/M-CAC* 引物对最高, 达 57.89%, 而 *P-ATT/T-ACA* 引物对最低, 为 11.36%。

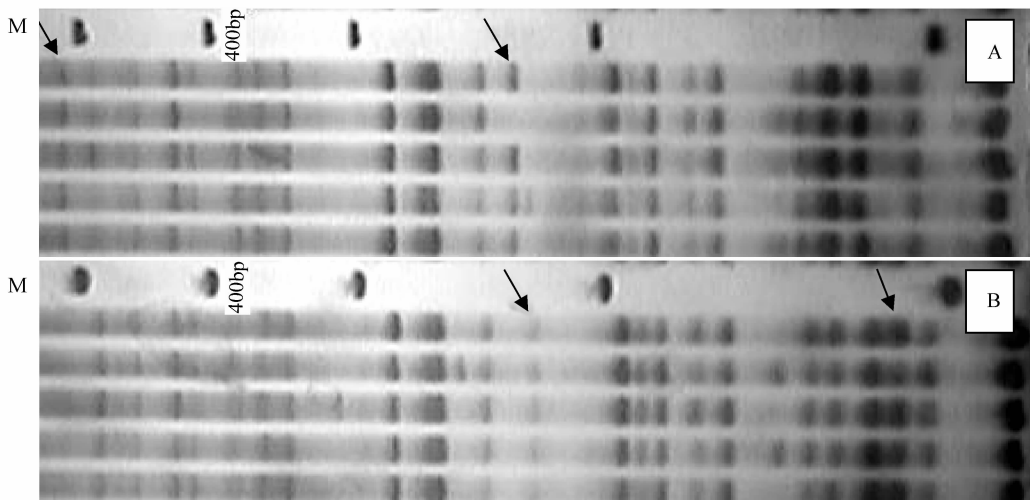


图 1 长臂 双酶切引物 *P + ATT/T + AAC* 扩增图谱

Fig. 1 Double-enzyme AFLP map of primer *P + ATT/T + AAC* in Pearl River and Hainan *Cranoglanis boudierius*

A: 珠江长臂 ; B: 海南长臂 ; M: 100bp DNA Ladder; 箭头所示为特异性条带

A: Pearl River *Cranoglanis boudierius*; B: Hainan *Cranoglanis boudierius*; M: 100bp DNA Ladder; the head of arrow mark the special band

表 1 分析采用的引物组合
Tab. 1 Primer combination in the research

	<i>E</i> -AAC	<i>E</i> -AAG	<i>E</i> -ACG	<i>E</i> -AGA	<i>E</i> -AGC	<i>P</i> -AAG	<i>P</i> -AAT	<i>P</i> -ACA	<i>P</i> -ATA	<i>P</i> -ATC	<i>P</i> -ATT
<i>M</i> -CAC	41/59	-	-	-	34/58	-	-	-	-	-	-
<i>M</i> -CAG	-	31/51	30/61	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M</i> -CCT	-	-	-	32/56	-	-	-	-	-	-	-
<i>M</i> -CTA	-	-	26/45	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M</i> -CTC	-	-	-	-	32/57	-	-	-	-	-	-
<i>M</i> -CTG	-	32/66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T</i> -AAC	-	-	-	-	-	27/42	-	-	-	-	25/55
<i>T</i> -ACA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12/46
<i>T</i> -ACG	-	-	-	-	-	-	-	-	29/45	-	-
<i>T</i> -AGA	-	-	-	-	-	31/62	-	-	-	15/44	-
<i>T</i> -ACT	-	-	-	-	-	-	22/42	-	-	-	-
<i>T</i> -ATC	-	-	-	-	-	-	26/52	-	-	-	-
<i>T</i> -ATG	-	-	-	-	-	-	-	28/43	-	16/50	-

注:分母显示检测到的片断的数目,而分子显示多态带的数目;“-”研究中没有被选用的引物组合

Note: Denominator is the number of bands, numerator is the number of polymorphic bands; ‘-’ show the primer combinations is no use

18 对引物从 60 尾长臀 中共检出 934 条扩增片段(50—800bp,不清晰的片段不计),每对引物扩增出的片段数目为 42—66 个,平均 51.89 个;其

中 489 个座位是多态性的,平均为 27.17 个,多态性座位所占比例为 52.36% (表 2)。

表 2 长臀 群体的检出条带、多态性条带数及比例

Tab. 2 The amplified bands, polymorphic bands and proportions detected from *C. boudierius* by AFLP

<i>E</i> / <i>M</i> 选择性引物 <i>E</i> / <i>M</i> selective amplification primer	检出条带数 NO. of amplification band		多态性条带数 NO. of polymorphic band		多态性片段比例 Percent of polymorphic band (%)		<i>P</i> / <i>T</i> 选择性引物 <i>P</i> / <i>T</i> selective amplification primer	检出条带数 NO. of amplification band		多态性条带数 NO. of polymorphic band		多态性片段比例 Percent of polymorphic band (%)			
	珠江	海南	珠江	海南	珠江	海南		珠江	海南	珠江	海南	珠江	海南	珠江	海南
<i>E</i> -AAC/ <i>M</i> -CAC	57	50	33	27	57.89	54	<i>P</i> -AAG/ <i>T</i> -AGA	59	57	18	19	30.51	33.33		
<i>E</i> -AAG/ <i>M</i> -CAG	50	48	20	21	40	43.75	<i>P</i> -AAT/ <i>T</i> -AGT	42	39	12	11	28.57	28.21		
<i>E</i> -AAG/ <i>M</i> -CTG	64	64	22	20	34.38	31.25	<i>P</i> -AAT/ <i>T</i> -ATC	50	50	15	14	30	28		
<i>E</i> -ACG/ <i>M</i> -CAG	61	55	20	24	32.79	43.64	<i>P</i> -ACA/ <i>T</i> -ATG	40	38	15	15	37.5	39.47		
<i>E</i> -ACG/ <i>M</i> -CTA	41	44	16	18	39.02	40.91	<i>P</i> -ATA/ <i>T</i> -ACG	43	42	17	16	39.53	38.1		
<i>E</i> -AGA/ <i>M</i> -CCT	49	55	21	22	42.86	40	<i>P</i> -ATC/ <i>T</i> -AGA	41	43	7	8	17.07	18.6		
<i>E</i> -AGC/ <i>M</i> -CAC	55	57	28	26	50.91	45.6	<i>P</i> -ATC/ <i>T</i> -ATG	49	49	9	9	18.37	18.37		
<i>E</i> -AGC/ <i>M</i> -CTC	53	55	18	21	32.72	38.18	<i>P</i> -ATT/ <i>T</i> -AAC	50	51	11	13	22	25.49		
<i>P</i> -AAG/ <i>T</i> -AAC	38	40	13	15	34.21	37.5	<i>P</i> -ATT/ <i>T</i> -ACA	43	44	6	5	13.95	11.36		

在珠江长臀 中 18 对引物共检测出 885 条片段,每对引物扩增出的片段数目为 38—64 条,平均 49.17 条;其中 301 个座位是多态性的,平均为 16.72 条,多态性座位所占比例为 34.01%。在珠江长臀 中以 *E*-AAG/*M*-CTG 引物的扩增片段最多(64 条),*P*-AAG/*T*-AAC 引物的扩增片段最少(38 条)。多态性条带数目最多的引物是 *E*-AAC/*M*-CAC(33 条),最少的引物是 *P*-ATT/*T*-ACA(6 条),其中多态片段的

比例则以 *E*-AAC/*M*-CAC 引物对最高(57.89%) ,而 *P*-ATT/*T*-ACA 引物对最低(13.95%)。在海南长臀 中 18 对引物共检测出 881 条片段,每对引物扩增出的片段数目为 38—64 条,平均 48.94 条;其中 304 个座位是多态性的,平均为 16.89 条,多态性座位所占比例为 34.51%。在海南长臀 中以 *E*-AAG/*M*-CTG 引物对扩增出的片段最多(64 条),*P*-ACA/*T*-ATG 引物对扩增出的片段最少(38 条)。多态性条带

数目最多的引物对是 *E-AAC/M-CAC* (27 条), 最少的引物对是 *P-ATT/T-ACA* (5 条), 其中多态片段的比例则以 *E-AAC/M-CAC* 引物对最高 (54%), 而 *P-ATT/T-ACA* 引物对最低 (11.36%)。

2.2 长臀 AFLP 指纹的差异

18 对引物检出的片段中, 445 条 (47.64%) 为全部个体所共有, 387 条 (41.43%) 为部分珠江长臀和海南长臀共有, 53 条 (5.67%) 仅见于珠江长臀, 49 条 (5.25%) 仅见于海南长臀。这些有差异的 AFLP 指纹图谱是珠江长臀区别于海南长臀的明显特征, 可以作为两者个体种质鉴别的辅助标记。18 对引物共扩增出 25 条特异性条带, *P-ATT/T-AAC* 引物最多 (4 条), 平均每对引物扩增 1.39 条; 其中 *E/M* 引物组合共扩增 6 条, *E-AAC/M-CAC* 引物最多 (2 条), 平均每对扩增 0.75 条; *P/T* 引物组合共扩增 19 条特异性条带, 平均每对扩增出 1.9 条。在珠江长臀群体共扩增出 11 条特异性条带; 在海南长臀群体共扩增出 14 条特异性条

带 (图 1)。

2.3 群体内和群体间的遗传相似度

群体内个体间的遗传相似度 (平均值) 珠江长臀种群为 0.9462 ± 0.0237 , 海南长臀为 0.9465 ± 0.0226 , 两者近似相等, 海南长臀比珠江长臀略高。群体间的遗传相似度 0.9367 ± 0.0231 , 小于两个群体内的遗传相似度, 两群体的遗传距离是 0.0634 ± 0.0230 。*E/M* 引物组合检测珠江长臀和海南长臀群体内的遗传相似度 (平均值) 分别为 0.9464 ± 0.0263 、 0.9470 ± 0.0251 , 群体间的遗传相似度是 0.9387 ± 0.0268 , 遗传距离是 0.0615 ± 0.0266 。*P/T* 组合检测珠江长臀和海南长臀群体内的遗传相似度 (平均值) 分别为 0.9460 ± 0.0229 、 0.94610 ± 0.0217 , 群体间的遗传相似度是 0.9351 ± 0.0210 , 遗传距离是 0.0649 ± 0.0210 。从遗传相似度、遗传距离考虑, 珠江长臀、海南长臀的遗传差异较小 (表 3)。

表 3 珠江长臀和海南长臀群体内和群体间的遗传相似度、遗传距离

Tab. 3 Values of genetic similarities and genetic distance within and between populations of Pearl River *C. boudierius* and Hainan *C. boudierius*

引物组合 Primer combination	珠江群体内遗传相似度 Values of genetic similarities within Pearl River <i>C. boudieriu</i>	海南群体内遗传相似度 Values of genetic similarities within Hainan <i>C. boudierius</i>	群体间遗传相似度 Values of genetic similarities between populations	群体间遗传距离 Values of genetic distance between populations
<i>E-AAC/M-CAC</i>	0.9013	0.9090	0.8972	0.1028
<i>E-AAG/M-CAG</i>	0.9608	0.9601	0.9592	0.0408
<i>E-AAG/M-CTG</i>	0.9713	0.9708	0.9686	0.0314
<i>E-ACG/M-CAG</i>	0.9576	0.9584	0.9483	0.0517
<i>E-ACG/M-CTA</i>	0.9542	0.9547	0.9412	0.0588
<i>E-AGA/M-CCT</i>	0.9318	0.9307	0.9231	0.0769
<i>E-AGC/M-CAC</i>	0.9751	0.9758	0.9643	0.0367
<i>E-AGC/M-CTC</i>	0.9189	0.9162	0.9074	0.0926
<i>P-AAG/T-AAC</i>	0.9310	0.9319	0.9231	0.0769
<i>P-AAG/T-AGA</i>	0.9427	0.9432	0.9310	0.0690
<i>P-AAT/T-AGT</i>	0.9721	0.9725	0.9630	0.0370
<i>P-AAT/T-ATC</i>	0.9750	0.9720	0.9600	0.0400
<i>P-ACA/T-ATG</i>	0.9013	0.9028	0.8974	0.1026
<i>P-ATA/T-ACG</i>	0.9553	0.9559	0.9412	0.0588
<i>P-ATC/T-AGA</i>	0.9618	0.9624	0.9524	0.0476
<i>P-ATC/T-ATG</i>	0.9382	0.9386	0.9296	0.0704
<i>P-ATT/T-AAC</i>	0.9254	0.9283	0.9109	0.0891
<i>P-ATT/T-ACA</i>	0.9574	0.9536	0.9425	0.0575
平均值 Average	0.9462 ± 0.0237	0.9465 ± 0.0226	0.9367 ± 0.0231	0.0634 ± 0.0230

2.4 长臀 AFLP 聚类结果

将所有样品作为一个群体,利用分析软件 NT-SYSp21 分析 AFLP 数据,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类。珠江长臀 群体和海南长臀 群体先各自聚成一支,再聚合到一起(图 2)。聚类图所有节点的 bootstrap 值均大于 50%,说明结果是可靠的。

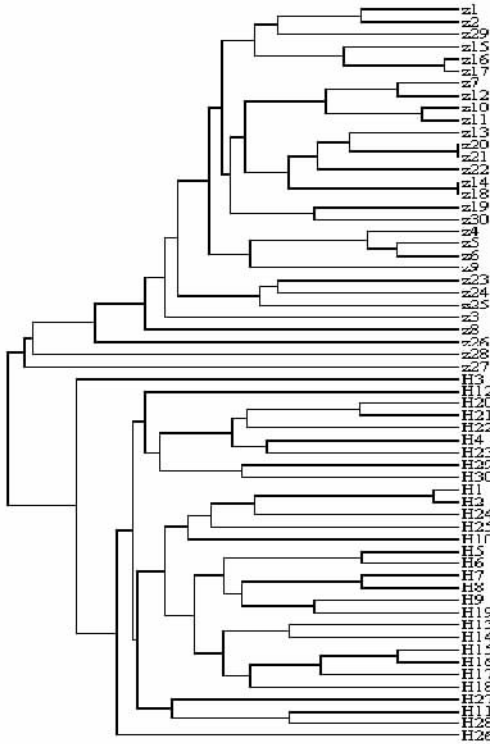


图 2 根据 18 引物 AFLP 图谱分析获得的遗传相似性所构建的长臀 群体 UPGMA 聚类关系图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *Cranoglanis boudierius* stock based on 18 pairs primer of AFLP

3 讨论

3.1 长臀 AFLP 的酶切组合分析

AFLP 技术一般采用两种限制性内切酶酶切,基因组酶切效果对实验结果影响较大,所以对内切酶的质量和种类要求较高^[7],目前常用的两种酶切组合是 *EcoR* I/*Mse* I 和 *Pst* I/*Taq* I。*Pst* I 和 *Taq* I 主要用于动物的 AFLP 分析,如梁智勇等^[8]利用 *Pst* I 和 *Taq* I 双酶切对 10 个品系小鼠进行了 AFLP 分析。在本实验中,对 *EcoR* I/*Mse* I 和 *Pst* I/*Taq* I 两种酶切组合在长臀 中的效果进行了比较。从实验结果分析:*EcoR* I/*Mse* I 组合的平均扩增条带数和多态性座位所占比例都明显高于 *Pst* I/*Taq* I 组合,表明 *EcoR* I/*Mse* I 组合更适合用于长臀 AFLP 多

样性分析。但是与其他实验比较 *Pst* I/*Taq* I 组合的平均扩增条带数和多态性座位比例并不低。张俊彬等^[9]利用 *EcoR* I/*Mse* I 酶切组合对紫红笛鲷遗传多样性进行了 AFLP 分析,每对 *EcoR* I/*Mse* I 引物扩增条带数在 54—74 之间,平均多态性座位比例为 50.81%;刘必谦等^[10]在岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析中采用了 *EcoR* I 和 *Mse* I 酶切组合,每对 *EcoR* I/*Mse* I 引物扩增条带数在 29—66 之间,平均每对引物扩增 42.4 条,多态性座位比例为 40.47%;与 *Pst* I/*Taq* I 组合在长臀 中的结果相当,而且,在实验中 *Pst* I/*Taq* I 组合扩增特异性条带数目高于 *EcoR* I/*Mse* I 组合,因此,*Pst* I/*Taq* I 组合更适合珠江长臀 和海南长臀 的鉴别。

3.2 长臀 AFLP 分析

AFLP 技术对于 DNA 多态性有很高的灵敏度,是进行多样性分析的有效手段。AFLP 分析中,多态比例和遗传差异度为衡量群体遗传多态性和群体间亲缘关系、遗传距离,提供了有用的比较与判别尺度^[11]。在实验中,珠江长臀 群体内的遗传相似性与海南长臀 相近,海南长臀 群体略高。群体间的遗传相似性小于两个群体内的遗传相似性,两群体的遗传距离是 0.0634 ± 0.0230 ,遗传差异较小。但是,群体间小于群体内的遗传相似性,UPGMA 聚类明显将珠江长臀 群体和海南长臀 分开,这都表明两者存在一定程度的遗传隔离,也说明两个群体产生了一定的遗传趋异。

3.3 长臀 属鱼类的物种有效性

自 1927 年 Koller^[12]命名了新种海南长臀 (*Pseudeutropichthys multiradiatu*) 后,关于珠江长臀 和海南长臀 物种有效性的争议就不断产生。Myers^[13]认定 *Cranoglanis sinensis* (珠江长臀) 和 *Cranoglanis multiradiatus* (海南长臀) 是两个明显的物种,并将这两个种归入一个独立的科,即长臀 科 (*Cranoglanidida*);褚新洛等^[14]根据形态差异将采自珠江水系的 *Cranoglanis boudierius* 以及采自云南元江和海南的 *Cranoglanis multiradiatus* 作为 *Cranoglanis boudierius* 的两个亚种;Ng^[15]在整理长臀 属鱼类时,认为长臀 属有三个有效种,即除珠江水系的长臀 (*Cranoglanis boudierius*) 和海南诸水系的海南长臀 (*Cranoglanis multiradiatus*) 外, *Anopleutropius hennci* 也为有效种;2005 年刘彩霞等^[1]对长臀 的可测量性状进行了主成分分析,认为长臀 属鱼类只存在一个有效种。在本研究中,UPGMA 聚类分析明显将珠江长臀 群体和海南长臀 分

开,群体间的遗传相似度小于群体内的遗传相似度,都表明两者存在一定程度的遗传隔离。Thorp^[16]通过分析认为:同科属群体间遗传相似系数在 0.1—0.5 之间;不同物种间遗传相似系数在 0.2—0.8 之间;同种群体间遗传相似系数在 0.8—0.97 之间,所以根据实验结果,珠江长臀 与海南长臀 应同属一个有效种,此结论符合形态分类结果。

参考文献:

- [1] Liu C X, Peng Z G, He S P. Study on species classification for *Genus cranoglanis* peters with the method of morphometrics [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(5): 507—512 [刘彩霞,彭作刚,何舜平.长臀 属鱼类多变量形态分析及物种有效性研究.水生生物学报,2005, **29**(5): 507—512]
- [2] Zhou L B, Liu X C, Ye W, *et al.* In vitro studies of effects of 17 β estradiol and methyltestosterone on gonadotropin secretion by pituitary of helmet catfish (*Cranoglanis boudierius*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(2): 113—118 [周立斌,刘晓春,叶卫,等.17 β -雌二醇和甲基睾酮对离体长臀 脑垂体促性腺激素分泌的影响.中国水产科学,2005, **12**(2): 113—118]
- [3] Yue P Q, Chen Y Y. Entreated animals red books of China [M]. Beijing: Science Press. 1998, 13—19 [乐佩琦,陈宜瑜.中国濒危动物红皮书——鱼类.北京:科学出版社.1998, 13—19]
- [4] Chen Q H, Xiao T Y, Liu Z. Utilization of AFLP marking technology in aquatic animal research [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, **20**(1): 69—72 [陈清华,肖调义,刘臻. AFLP 技术在水产动物研究中的应用.大连水产学院学报,2005, **20**(1): 69—72]
- [5] Xu S B, Tao Y F, Yang Z Q, *et al.* A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas*, 2002, **24**(3): 335—336 [许绍斌,陶玉芬,杨昭庆,等.2002.简单快速的 DNA 银染和胶保存方法.遗传,2002, **24**(3): 335—336]
- [6] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, 1990, **7**: 478—484
- [7] Li S, Zhao G F. AFLP molecular marker and its application [J]. *Acta Bot. Boreal Occident. Sin*, 2003, **23**(5): 830—836 [李珊,赵桂芳. AFLP 分子标记及其应用.西北植物学报,2003, **23**(5): 830—836]
- [8] Liang Z Y, Shi J Q, Wei H, *et al.* AFLP analysis of 10 strains of mice [J]. *Acta Academic Medicinae Militaris Tertiae*, 2003, **25**(2): 155—159 [梁智勇,史景泉,魏泓,等.10 个品系小鼠的 AFLP 分析.第三军医大学学报,2003, **25**(2): 155—159]
- [9] Zhang J B, Huang L M. Analyses of genetic diversity of *Lutjanus argentimaculatus* by AFLP molecular technique [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2004, **23**(5): 50—55 [张俊彬,黄良民.紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析.热带海洋学报,2004, **23**(5): 50—55]
- [10] Liu B Q, Dong W Q, Wang Y J, *et al.* Identification of germ plasm in *Pseudosciaena crocea* Tai Chu race by AFLP [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(4): 413—416 [刘必谦,董闻琦,王亚军,等.岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析.水生生物学报,2005, **29**(4): 413—416]
- [11] Wang Z, Jayasankar P, Khoo S K, *et al.* AFLP fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia [J]. *Asian Fisheries Science*, 2000, **13**: 139—147
- [12] Koller O. Fish von der Insel Hainan [J]. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 1927, **41**: 25—49
- [13] Myers G S. On the fishes described by Koller from Hainan in 1926 and 1927 [J]. *Lingnan Science Journal*, 1931, **10**: 255—262
- [14] Chu X L, Chen Y R. The fishes of Yunnan, China. Part II [M]. Beijing: Science Press. 1999, 313
- [15] Ng H H. *Cranoglanis henrici* (Vaillant, 1893), a valid species of *Cranoglanidid* catfish from Indochina (*Teleostei, Cranoglanididae*) [J]. *Zoosystema*, 2000, **22**(4): 847—852
- [16] Thorp J P. The molecular dock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematic [J]. *Annual Review of Ecology Systematics*, 1982, **13**(1): 139—168

GENETIC ANALYSIS OF *CRANOGLANIS BOUDERIUS* BY MOLECULAR MARKER AFLPCHENG Fei^{1,2}, XIE Song-Guang², YE Wei³ and YE Fu-Liang¹

(1. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

3. Guangdong Oreochromis Breeding Farm, Guangzhou 511453)

Abstract: The genus *Cranoglanis* is a group of fish only distributed in East Asia. They live in the drainages of Guangdong, Guangxi, Yunnan and Hainan Province, China, and the Red River drainage in northern Vietnam. At present, the wild resource of *Cranoglanis boudierius* has decreased rapidly because of excess utilized, and there are still some arguments on the validity of the species of the genus *Cranoglanis*. In order to determining the genetic structure and the validity of the species, AFLP technique was used to analyze the genetic diversity of Pearl River *C. boudierius* and Hainan *C. boudierius*. Sixty individuals from the two populations (thirty individuals per population) were analyzed by using eighteen primer combinations. The amplified bands of the eighteen primer combinations were in focus and repeated. The models of amplified band had distinct difference. The result of study showed that both populations had high percent of polymorphic loci and number of special bands. The genetic similarities was 0.9462 ± 0.0237 and 0.9465 ± 0.0226 within the population of Pearl River *C. boudierius* and the population of Hainan *C. boudierius* respectively, and was 0.9367 ± 0.0231 between Pearl River *C. boudierius* and Hainan *C. boudierius*, the genetic similarities between populations was lower than that within population. The genetic distance was 0.0634 ± 0.0230 between Pearl River *C. boudierius* and Hainan *C. boudierius*. The analyzed of phylogenetic trees of two populations suggested that individuals of the same population combined together at first, and then two populations combined. The preliminary analysis result indicates that there are no prominent differences between genetic structure of Pearl River *C. boudierius* and Hainan *C. boudierius*, so they should be considered as one species.

Key words: *Cranoglanis boudierius*; AFLP; Genetic diversity

《水生生物学报》编辑委员会

ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA EDITORIAL BOARD

主 编 **Chief Editor** 桂建芳 GUI Jian-Fang

副主编 **Associate Editors** 解绶启 XIE Shou-Qi

委 员 **Members** (以姓氏拼音为序)

蔡庆华 CAI Qing-Hua

陈家宽 CHEN Jia-Kuan

高坤山 GAO Kun-Shan

胡征宇 HU Zheng-Yu

林浩然 LIN Hao-Ran

麦康森 MAI Kang-Sen

沈韞芬 SHEN Yun-Fen

王 丁 WANG Ding

相建海 XIANG Jian-Hai

谢小军 XIE Xiao-Jun

徐旭东 XU Xu-Dong

余其兴 YU Qi-Xing

朱作言 ZHU Zuo-Yan

曹文宣 CAO Wen-Xuan

陈宜瑜 CHEN Yi-Yu

何舜平 HE Shun-Ping

李文鑫 LI Wen-Xin

刘建康 LIU Jian-Kang

聂 品 NIE Pin

宋立荣 SONG Li-Rong

吴灶和 WU Zao-He

肖 伟 XIAO Wei

熊邦喜 XIONG Bang-Xi

杨先乐 YANG Xian-Le

游 力 YOU Li

Harald Rosenthal(德国)

常剑波 CHANG Jian-Bo

陈毅峰 CHEN Yi-Feng

洪云汉 HONG Yun-Han

李钟杰 LI Zhong-Jie

刘永定 LIU Yong-Ding

曲久辉 QU Jiu-Hui

唐启升 TANG Qi-Sheng

吴振斌 WU Zhen-Bin

谢 平 XIE Ping

熊思岳 XIONG Si-Yue

于 丹 YU Dan

张奇亚 ZHANG Qi-Ya

编辑部 **Editorial office** 杜新征 DU Xin-Zheng 王 芹 WANG Qin 余 茜 YU Xi