

河南刺猬种群的遗传多样性研究

赵 飞¹, 路纪琪¹, 王理顺²

(1. 郑州大学生物工程系 郑州 450001; 2. 河南省经济林和林木种苗工作站 郑州 450008)

摘要: 为正确评价刺猬种群间的遗传关系,利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术,对河南刺猬种群的遗传多样性进行研究.共扩增出 89 个位点,片段大小为 200~1 650 bp,多态位点百分率 (P) 为 89.89%,Nei's 基因多样性 (H) 为 0.328 1 \pm 0.172 0,Shannon's 多样性信息指数 (I) 为 0.484 6 \pm 0.229 8,种群间遗传相似度平均为 0.806 0,群体间遗传距离平均为 0.222 8.结果表明,周口种群与信阳种群之间的遗传关系最近,信阳种群与濮阳种群之间的遗传关系最远,说明地理隔离可能是造成河南刺猬种群遗传差异的主要原因.

关键词: RAPD; 刺猬; 遗传多样性

中图分类号: Q 349⁺.13

文章编号: 1671-6841(2008)04-0100-05

0 引言

刺猬 (*Erinaceus europaeus*) 是一种较原始的哺乳动物,属于真兽亚纲食虫目,体型小,外形似鼠,鼻吻部细长,主要以昆虫的成虫或幼虫为食,兼食其他小动物和植物性食物.刺猬是传统的药用动物,其皮、肉和胆等均可入药,具有一定的开发和利用价值^[1-3].了解刺猬遗传多样性及其种群关系,对于探讨其起源与进化、合理保护以及科学开发利用这一资源具有指导意义.

目前,刺猬的分类和人工养殖已有较多报道^[2-5],但尚未见从分子水平上研究其遗传进化关系的报道.随着分子标记技术的发展和运用,为研究物种间关系和起源演化提供了新方法和新途径.RAPD 技术因其无需知道目标基因序列,且简便、快捷、实验成本低,被广泛用于物种群体遗传学分析、起源进化和分类研究及构建遗传连锁图谱等研究领域^[6-12].本研究拟利用 RAPD 技术对河南省不同区域内的刺猬种群进行遗传多样性分析,旨在分析种群间的遗传变异和相互关系,为系统分类提供新的参考和分子水平的依据,并为刺猬资源的保护和可持续利用提供基础资料.

1 材料和方法

1.1 材料

研究所用刺猬样品分别采自河南省的南阳(东经 110°58'~113°49',北纬 32°17'~33°48')、信阳(东经 113°45'~115°55',北纬 30°23'~32°27')、周口(东经 114°38',北纬 33°37')、濮阳(东经 114°52'~116°05',北纬 35°20'~36°12').取上唇部肌肉组织提取基因组 DNA.

实验所用引物由北京博迈德科技发展有限公司合成,G+C 含量为 60%~70%;Taq 酶和 Marker DL2000 由 Tiangen Biotech(Beijing) Co. Ltd 生产,DNA 提取试剂盒由安徽优晶生物公司生产,其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

基因组提取按照试剂盒说明进行,提取结果用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行检测分析,按实验

收稿日期:2008-04-10

基金项目:河南省自然科学基金资助项目,编号 0424030030;郑州大学引进人才科研启动基金资助项目.

作者简介:赵飞(1973-),男,硕士研究生,主要从事动物学研究,E-mail:zf_223773@tom.com;通讯联系人:路纪琪(1964-),男,教授,博士,主要从事动物生态学和保护生物学研究,E-mail:lujq@zzu.edu.cn.

所需浓度在 -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物筛选和 PCR 扩增

实验所用 10 条随机引物是从 35 条引物中通过可重复性分析筛选出来的,先用刺猬基因组对所有引物进行扩增,选择产物清晰且重复性好的引物用于实验(表 1)。

表 1 10 条 RAPD 随机引物及碱基序列
Tab.1 Ten RAPD primers and their sequences

引物	引物序列	G+C 含量/ %	引物	引物序列	G+C 含量/ %
S-6	TGCTCTGCCC	70	S-1006	GTAA GCCCCT	60
S-16	AA GGCGGCA G	70	S-1213	GGGTCGGCTT	70
S-266	AGGCCCGATG	70	S-1217	CCACCACGAC	70
S-388	AGCA GGTGGA	60	S-2008	CCACA GCCGA	70
S-512	ACA GGTGCGT	60	S-2088	GGGAA GCGTC	70

扩增反应条件参考文献 [6-18] 并进行优化。反应总体积为 25 μ L,其中含有 10 \times Buffer 2.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L、2 mmol/L dNTPs 2 μ L、2.5 g/L 明胶 1 μ L、5 U/ μ L Taq 酶 0.3 μ L、10 μ mol/L 引物 1 μ L、10 g/L 模板 DNA 3 μ L、双蒸水 13.2 μ L。

反应在 PTC-100 热循环扩增仪上进行,扩增条件如下:先经 94℃ 预变性 4 min;然后进行 40 个循环,每个循环由 94℃ 变性 30 s,36℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min 组成;最后一个循环结束后 72℃ 延伸 8 min。空白对照以等体积的 ddH₂O 替代基因组 DNA,其他组成与上述反应体系相同。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳分析

扩增产物用质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.05 mg/L 溴化乙锭)电泳进行分析。电泳电压 4~5 V/cm,电泳缓冲液 1 \times TAE,电泳结果先在紫外灯下观察,对效果好者用凝胶成像系统(SYN GENE)拍照分析。根据 DNA 片段在电场中的迁移率与其相对分子质量的对数值成反比,以 DNA Marker DL2000 为标准,用 GENETOOL 软件标记出各扩增片段的大小。

1.2.4 数据处理

根据分析结果,按同源性条带的有无分别记录为 1 和 0,当扩增条带出现时记为 1,无扩增条带出现时记为 0,构成数据矩阵并输入计算机,利用 POPGENE 1.32 软件进行分析^[13]。计算出多态位点百分率(P)、Shannon's 多样性信息指数(I)、Nei's 基因多样性(H)、Nei's 遗传距离(D)和遗传相似性(F),并根据遗传距离矩阵用 PHYLIP version 3.5 程序(UPGMA 法)聚类,分析各群体之间的遗传关系。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

用筛选出的 10 条随机引物分别对 28 个个体进行扩增,扩增结果表现出良好的多态性。共记录清晰条带 89 个,条带大小为 200~1 650 bp,每条引物扩增的条带平均为 8.9 条(表 2)。部分扩增结果见图 1、图 2。

2.2 遗传分析结果

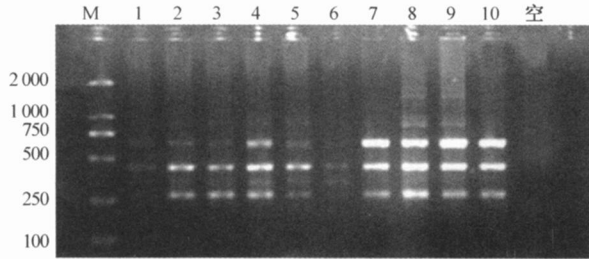
利用 POPGENE 软件对扩增结果矩阵进行处理,得到如下数据:多态位点百分率(P)为 89.89%,Nei's 基因多样性(H)为 0.328 1 \pm 0.172 0,Shannon's

表 2 随机引物扩增带数

Tab.2 The amplified bands of primers

引物	序列	RAPD 标记数	扩增片段大小/ bp
S-6	TGCTCTGCCC	6	320~1 100
S-166	AA GGCGGCA G	7	320~1 300
S-266	AGGCCCGATG	10	225~1 200
S-388	AGCA GGTGGA	8	265~950
S-512	ACA GGTGCGT	9	240~1 400
S-1006	GTAA GCCCCT	12	250~1 480
S-1213	GGGTCGGCTT	9	200~870
S-1217	CCACCACGAC	9	220~1 050
S-2008	CCACA GCCGA	9	270~1 650
S-2088	GGGAA GCGTC	10	250~1 120

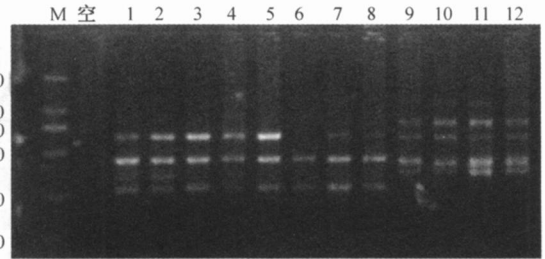
多样性信息指数(D)为 0.4846 ± 0.2298 , Nei's 遗传距离和遗传相似度分析结果见表3, 遗传分化系数值为 0.3599 , 产生的基因流平均值为 0.8893 , 即总的遗传变异中有 64.01% 的变异存在于种群内部, 种群间的遗传变异占总遗传变异的 35.99% , 表明不同地区种群间已有一定程度的遗传分化。



M: DNA Marker DL2000; 1~8: S-2008 引物-南阳; 9~10: S-2008 引物-濮阳; 空: 空白对照

图1 引物 S-2008 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RAPD products by primers S-2008



M: DNA Marker DL2000; 2~8: S-2008 引物-周口; 9~12: S-2088 引物-周口; 空: 空白对照

图2 引物 S-2008 和 S-2088 扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of RAPD products by primers S-2008 and S-2088

由表3可知, 种群间遗传相似度平均为 0.8060 , 群体间遗传距离为 $0.0926 \sim 0.3651$, 平均为 0.2228 . 周口与信阳种群之间遗传相似度最大, 为 0.9115 , 信阳与濮阳种群之间遗传相似度最小, 为 0.6941 . 从遗传距离来看, 周口与信阳种群遗传距离最小, 为 0.0926 , 信阳与濮阳种群遗传距离最大, 为 0.3651 . 以上结果表明周口与信阳种群间亲缘关系最近, 信阳与濮阳种群间亲缘关系最远。

表3 种群间 RAPD 片段的遗传相似度和遗传距离

Tab. 3 The proportion of shared RAPD fragments and the genetic distance

种群	周口	信阳	南阳	濮阳
周口	* * * *	0.911 5	0.900 3	0.722 7
信阳	0.092 6	* * * *	0.893 5	0.694 1
南阳	0.105 0	0.112 7	* * * *	0.714 2
濮阳	0.324 8	0.365 1	0.336 6	* * * *

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传相似度。

2.3 种群遗传聚类

用 PHYLIP version 3.5 程序对表3 遗传距离矩阵进行分析, 以 UPGMA 法聚类, 得到遗传聚类图3. 结果表明, 4 个种群聚成两个分枝: 首先是周口与信阳种群聚在一起, 然后再与南阳种群聚在一起成为一个分枝; 濮阳种群则单独成为一个分枝. 表明濮阳种群与其他 3 个类群差异显著, 具有与另 3 个类群相对独立的种群特征。

3 讨论

3.1 研究方法

RAPD 技术为研究种及种下不同群体乃至个体间的遗传多样性提供了有效的手段, 其最重要的步骤是筛选引物, 合适的引物是扩增到高产量、高分辨率、高多态性 RAPD 指纹的前提^[12-15]. 本实验首先对引物进行筛选, 选出条带清晰、重复性好的引物用于实验, 从而提高了实验结果的可信度. 从扩增结果看, 没有发现扩增结果完全一样的个体, 对照组无任何扩增, 进一步证实了扩增图谱的差异是由于个体间或群体间的 DNA 组成差异造成的. 以 RAPD 谱带为遗传标记检测刺猬基因组变异情况, 分析比较这一物种的遗传多样性, 能为追踪和评估其可能的变化趋势与生

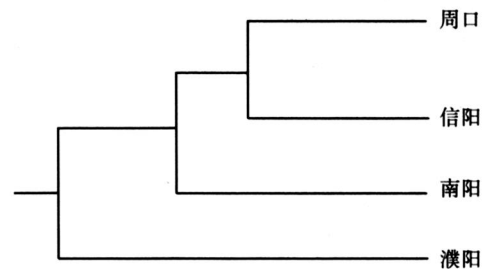


图3 河南省4个地区间刺猬种群关系聚类图
Fig. 3 Phylogenetic tree of the *Erinaceus europaeus* from four regions of Henan Province

存状况提供一个可衡量的具体数量指标。本实验所用刺猬样品均采自野生环境,实验结果能比较客观地反映河南刺猬种群在自然生长条件下的遗传变异情况。

3.2 变异因素讨论

研究结果表明,不同地区种群间已存在一定程度的遗传差异,总遗传变异达 35.99%,这可能是以下因素共同作用的结果。

1) 地理分布差异的影响。周口、信阳和南阳都位于黄河以南,南阳位于伏牛山以南,属于盆地,信阳属于山丘,周口属于平原,而濮阳位于黄河以北,不同地理隔离导致栖息地不连续,可使基因流在一定程度上受阻,造成种群在空间上呈间断分布,阻碍种群间基因交流^[13,15],从而导致种群间的遗传分化。

2) 与其生物学特性有较大关系。刺猬是较原始的一类小兽,活动范围较小,且喜爱群居生活,可能限制了种内不同群体间的随机交配,致使隔离小种群具有较低的遗传多态性,并经历更高的近交压力。

3) 小种群内遗传漂变的影响也会加剧种群间遗传分化。有研究表明,基因流至少大于 1 时,才能克服遗传漂变对种群产生的显著影响^[16-18]。从分析结果看,刺猬种群平均基因流仅为 0.889 3,表明遗传漂变对刺猬群体仍具有明显的遗传效应,也可能会加大群体间的遗传差异。

4) 气候差异也可能会产生一定影响。信阳在河南的最南端,属于北亚热带,而濮阳在河南的最北边,属于暖温带,二者气候存在着差异,这在一定程度上也可能影响着刺猬的生活习性和遗传进化水平。

迄今为止,对刺猬遗传多样性研究还很少,仅根据本研究获得的有限数据尚不足以为该物种的遗传多样性设定一个正常范围,但本文研究结果作为一种相对指标并与其他指标相结合,可为系统研究与追踪刺猬的遗传变异水平和趋势、资源保护与可持续利用、人工饲养繁殖、杂交育种等方面提供参考资料。

参考文献:

- [1] 李锦飞. 本草纲目:兽部 [M]. 北京:人民文学出版社,2005.
- [2] 张培,王玉琴,徐延最. 刺猬的药用与饲养[J]. 中国林副特刊,2001,57(2):37.
- [3] 赵飞,路纪琪,王理顺. 药用动物刺猬的开发和利用[J]. 河南林业科技,2007,27(2):35-36.
- [4] 马文祥,曲阜孔林刺猬生态习性的研究[J]. 生物学杂志,2001,18(4):18-28.
- [5] 滕兆乾,刘长梅,林育真. 刺猬的生态习性养殖与开发利用[J]. 烟台师范学院学报:自然科学版,2001,17(2):131-133.
- [6] 郝家胜,周开亚. 皖西白鹅遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版,1999,22(3):40-43.
- [7] 任军,黄路生,高军,等. 利用随机扩增多态 DNA 技术对江西地方黑猪群体遗传关系的初步研究[J]. 中国畜牧杂志,2000,36(4):13-15.
- [8] Xiao Xianghong, Zheng Dong, Li Feng, et al. Population genetic diversity and regional differentiation of Chinese forest frogs (*Rana chensinensis*) in Heilongjiang Province[J]. Journal of Forestry Research, 2001, 12(1): 40-42.
- [9] 王思芳,顾耘,顾颂东. 四个齿爪鳃金龟类群分类地位的 RAPD 分析[J]. 华东昆虫学报,2002,11(2):26-29.
- [10] Pinto W A, Galetti Jr P M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species [J]. Hydrobiologia, 2002, 474: 131-137.
- [11] Atopkin D M, Bogdanov A S, Chelomina G N. Genetic variation and differentiation in striped field mouse *A. podemus agrarius* inferred from RAPD-PCR analysis[J]. Russian Journal of Genetics, 2007, 43(6): 665-676.
- [12] 高成伟,庞广福,周善义,等. 不同巢穴尼科巴弓背蚊的 RAPD 分析[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2007,25(1):100-103.
- [13] 张锡元,孙羽中,晏婷婷,等. 螳螂独缩虫 (*Cachesium polypinum*) 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性,2000,8(3):257-261.
- [14] 方盛国,吴萍英. 拉萨地区小云雀 (*Alauda gulgula inopinata*) 遗传多样性的 DNA 指纹图分析[J]. 四川师范大学学报:自然科学版,1996,19(2):79-82.
- [15] 崔淑芳,郝光荣,汤球,等. NJS 小鼠与其亲本小鼠遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国实验动物学报,2003,11(4):237-239.
- [16] 谢佳燕,张知彬. 华北地区大仓鼠种群的遗传变异[J]. 兽类学报,2006,26(1):64-67.

- [17] Xie Jiayan, Zhang Zhibin. Genetic diversity decreases as population density declines: implications of temporal variation in mitochondrial halotype frequencies in a natural population of *Tscherskia triton* [J]. Integrative Zoology, 2006, 1: 188-193.
- [18] Slatkin M. Gene flow in natural population[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1985, 16: 393-430.

Research on the Population Genetic Diversity of *Erinaceus europaeus* in Henan Province

ZHAO Fei¹, LU Ji-qi¹, WANG Li-shun²

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Station of Economic Forest and Seeds and Seedling of Henan, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: The random amplified polymorphism DNA (RAPD) markers are used to study the genomic DNA polymorphism of four *Erinaceus europaeus* populations among four sites of Nanyang, Xinyang, Zhoukou and Puyang in Henan Province. Total 89 polymorphic DNA loci from 200 bp to 1 650 bp are amplified by 10 RAPD primers. Among those local populations, the percentage of polymorphic loci (P) is 89.89%, Nei's gene diversity (H) is 0.3281 ± 0.1720 , Shannon index (I) is 0.4846 ± 0.2298 . The results show that the genetic relationship between Xinyang and Zhoukou population is the closest, while that between Xinyang and Puyang population is the most distant. The results from this research indicate that geographical isolation can lead to more genetic diversity within populations of animal species.

Key words: RAPD; *Erinaceus europaeus*; genetic diversity