

我国六个地区银鲫种群 线粒体 DNA 多态性的研究

姚纪花 楼允东 江 涌
(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘 要 本文用一对引物对我国 6 个地区的银鲫进行 mtDNA—ND5/6 片段的 PCR 扩增, 扩增产物(约 2.5Kb)用 6 种限制性内切酶进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析。共获得 11 种图谱和 7 种限制性类型(基因型)。根据各群体间的遗传距离构建了 UPG 聚类关系图。结果表明, 6 个银鲫种群中, 云南群体与贵州群体的关系以及黑龙江与安徽群体之间的关系最近, 它们分别归为一个群体; 河南群体相对独立, 它与黑龙江和安徽群体的遗传关系较近; 江西群体与各群体间的亲缘关系最远。

关键词 银鲫, 种群, 线粒体 DNA, 限制性片段长度多态性

近年来, 线粒体 DNA 限制性片段长度多态性(mtDNA RFLP)分析技术的发展及其应用, 给群体遗传学和进化生物学带来了新的手段。mtDNA 由于具有结构简单、呈母系遗传、进化速度快等特点, 对于调查动物群体遗传多样性、研究近缘种及种内群体间的遗传差异、分析种内及种间的遗传分化特别有效[Brown 1983]。PCR 技术的诞生和发展, 使 mtDNA—RFLP 分析技术更为有效。通过 PCR, mtDNA 分子中的特异区段可以有选择地扩增出来。PCR 技术不仅比传统的 DNA 方法快速, 还可以避免材料上的限制, 更重要的是, PCR 产物可直接用于测序及 RFLP 分析[Cronin 等 1993]。目前, 国外在鱼类方面已有不少相关的报道[Bernachez 等 1992、1995, Bernachez 和 Osinov 1995, Billington 等 1991, Cronin 等 1993, Hall 和 Nawrocki 1995, Lu 等 1997, Park 等 1993]。而在国内, 以此分析为手段, 研究鱼类的遗传分化及系统发育关系方面的工作极少[张亚平 1992]。

银鲫(*Carassiu auratus gibelio*)在分类上属鲫(*Carassiu auratus*)的一个亚种, 广泛分布于我国的许多地区。对它们的遗传背景, 已有过一些探讨, 然而至今对银鲫群体的分化和遗传多样性却了解很少。我们对来自我国 6 个主要地理种群的银鲫即黑龙江方正银鲫、江西彭泽鲫、河南淇河鲫、安徽滁州鲫、云南滇池鲫和贵州草海鲫进行 mtDNA 的一个区段(包括 ND5 和 ND6 二个基因)的 PCR 扩增并进行 RFLP 分析, 从分子水平上探讨银鲫各群体间的亲缘关系与变异程度, 旨在为银鲫种质资源的保存及品种选育提供资料。

收稿日期: 1998—01—21

1 材料和方法

1.1 材料

将来自6个地区的36尾银鲫,按产地分为6组(表1),取不同组织置于低温冰箱(-60℃)冻存或用纯酒精保存,备用。各群体的地理位置见图1。

表1 银鲫材料来源

Tab. 1 Collection localities of *Carassius auratus gibelio* used in study

种群	采集地	组织	编号
彭泽鲫	江西九江市水产研究所	卵巢、肝脏	CPZ(1~8)
滁州鲫	安徽滁州市西水库	卵巢、肝脏	CCZ(1~8)
淇河鲫	河南鹤壁市白龙庙村段淇河	卵巢、肝脏	CQH(1~6)
滇池鲫	云南昆明滇池	卵巢、肝脏	CDC(1~5)
方正银鲫	黑龙江方正县双凤水库	肌肉、肝脏	CFZ(1~5)
草海鲫	贵州威宁草海	肌肉、肝脏	CCH(1~4)

1.2 试剂

扩增 mtDNA-ND5/6 的引物参照 Cronin 等[1993],由北京赛百盛(美国)生物工程公司合成;4种 dNTP、λDNA/EcoR I + Hind III 和饱和酚等购自华美生物工程公司;Protein K、Taq DNA 聚合酶及 Alu I、Hae III、Nco I 和 Rsa I 等4种限制性内切酶购自 Promega 公司;Bst I 和 Dpn II 等2种限制性内切酶购自 Bio-Rad 公司;其它试剂均用国产分析纯。



图1 六个银鲫种群的地理分布

Fig. 1 Geographical distribution for six populations of *C. auratus gibelio*

1.3 方法

总 DNA 的提取和 PCR 扩增:按 Bernatchez 等[1992]描述的方法提取总 DNA。用 PE-480 温度循环仪进行 PCR 扩增。每个 PCR 反应体系由下列成分组成:0.5~1μg 的总 DNA;5μl 的 10x 缓冲液;4μl(25mM)的 MgCl₂;5μl(4种 dNTP 各 2mM)的 dNTP 混合液,两种引物各 100Pmol, Taq 酶 2.5~5u,加双蒸水至总体积 50μl,上面再覆盖 50~100μl 的石蜡油。反应条件:95℃预变性 1min,1个循环;95℃45sec、50℃30sec、70℃2min30 sec,32个循环;最后 70℃延伸 3 min。

扩增产物的限制性酶切和琼脂糖凝胶电泳:DNA 限制性酶切采用厂家提供的缓冲液和推荐的使用方法。酶解溶液体积为 20μl,内含 1~2μg 左右的 PCR 产物和 5~10u 的限制性内切酶,37℃(Bst I 60℃)下消化 1 小时左右。配制 1.2%左右的琼脂糖平板凝胶(14cm×11cm×0.5cm)(含适量 EB),用 Tris-硼酸电极缓冲液,电压为 3 伏/厘米左右,电泳 1.5~2 小时后,紫外灯下观察拍照。

遗传距离的计算和 UPG 系统树的建立: 通过限制性片段途径, 依照 Nei 和 Li [1979] 的方法, 计算群体间的遗传距离, 应用 MEGA (Version 1.01) 软件中的 UPGMA 程序构建聚类分析图。

2 结果

2.1 mtDNA-ND5/6 的限制性类型及在各群体间的分布

用 6 种限制性内切酶 Alu I、Bst I、Dpn II、Hae III、Nco I、Rsa I 对 36 个样品的 PCR 产物 mtDNA-ND5/6 进行酶解分析, 共获得 11 种图谱和 7 种限制性类型 (Haplotypes) 或基因型 (Genotypes), 为了简炼起见, 文中仅给出部分酶切电泳照片 (图 2)。

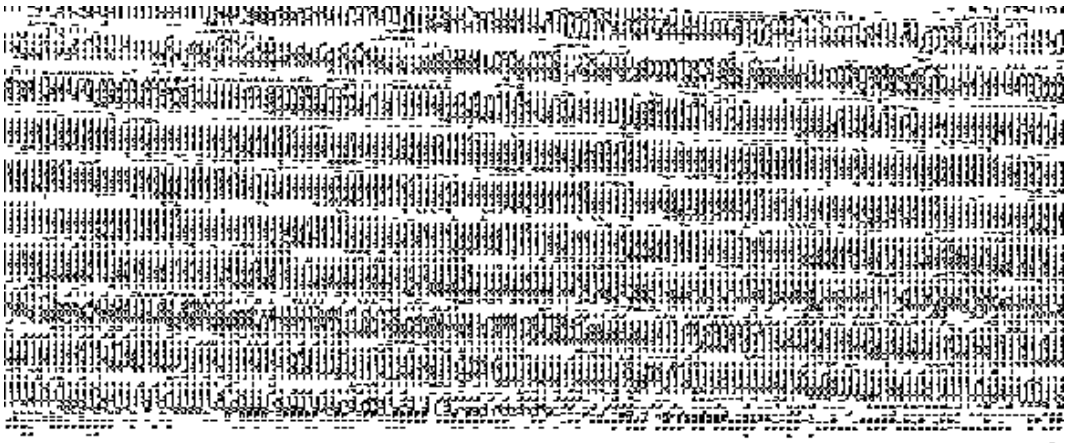


图 2 不同银鲫种群 mtDNA-ND5/6 的酶切图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns in different populations of *C. auratus gibelio* mtDNA-ND5/6

A: RsaI 1. λ DNA/ EcoRI + Hind III 2. mtDNA-ND5/6 的 PCR 产物, 3~8 CPZ (1~6), 9~14. CCZ (1~6);

B: DpnII 1~6. CCZ (1~6), 7~12 CPZ (1~6), 13. mtDNA-ND5/6 的 PCR 产物, 14. λ DNA/ EcoRI + Hind III

C: NcoI 1. λ DNA/ EcoRI + Hind III 2~3. CCZ (5~6), 4~5. CQH (1, 7), 6~11. CPZ (1~6), 12~13. CDC (1~2);

D: NcoI 1. λ DNA/ EcoRI + Hind III 2. mtDNA-ND5/6 的 PCR 产物, 3~6. CCZ (1~4), 7~8. CCZ (7~8), 9~

13. CQH (2~6), 14. CQH (8)

以 λ DNA/ EcoRI + Hind III 为分子量标记, 测出各限制酶切反应所得片段的大小, 测得 mtDNA-ND5/6 片段的长度约为 2.5Kb, 各种类型的限制性片段的分子量列入表 2, 限制性

类型在各群体中的分布见表3。

表2 银鲫 mtDNA-ND5/6 片段的限制性类型及其各片段的长度

Tab. 2 Restriction types and list of fragments of the mtDNA-ND5/6 gene of *C. auratus gibelio*

内切酶	类型	片段长度(Kb)					类型	片段长度(Kb)			
		0.81	0.72	0.40	0.30	0.2*		1.10	0.72	0.40	0.30
Alu I	A	0.81	0.72	0.40	0.30	0.2*	B	1.10	0.72	0.40	0.30
Bst u I	A	2.10	0.40								
Dpn II	A	1.85	0.45	0.2*			B	1.01	0.83	0.45	0.2*
Hae III	A	0.71	0.60	0.50	0.39	0.30					
Nco I	A	1.10	0.68	0.68			B	1.72	0.78		
	C	0.86	0.86	0.78							
Rsa I	A	1.27	0.72	0.50			B	1.78	0.72		

*表示估计值

表3 银鲫 6 个种群中 mtDNA-ND5/6 限制性类型的分布

Tab. 3 The distribution of haplotypes among 6 populations of *C. auratus gibelio*

限制性类型 (基因型)	限制性酶						地理种群					
	Alu I	Bst u I	Dpn II	Hae III	Nco I	Rsa I	CPZ	CCZ	CQH	CDC	CFZ	CCH
1	A	A	A	A	A	A	2	0	0	0	0	0
2	A	A	A	A	A	B	4	0	0	0	0	0
3	B	A	B	A	B	A	0	5	3	4	3	3
4	A	A	B	A	A	B	0	2	2	0	0	0
5	A	A	B	A	A	A	0	1	0	0	2	0
6	A	A	B	A	B	B	0	0	2	1	0	1
7	A	A	B	A	C	B	0	0	1	0	0	0

本实验中,6 个群体内均检出了 mtDNA 的多态性。除云南和贵州群体间没有检出差别外,各群体间也均存在 mtDNA 的多态。此外,除了彭泽群体,其它群体间均有一至两种相同的限制性类型分布,其中类型 3 为五个群体所共有,出现频率达到 50%。选用的 6 种酶中,可检出 mtDNA 多态性的酶有 Alu I、Dpn II、Nco I、Rsa I。

2.2 银鲫群体间的遗传距离及 UPG 系统图

根据 6 种酶的酶切结果求出江西彭泽、安徽滁州、河南淇河、云南滇池、黑龙江方正、贵州草海等 6 个群体间的遗传距离,列入表 4。根据遗传距离,用 UPG 法构建了 6 个群体的聚类关系图(图 3)。从图中可看出,在 6 个银鲫种群中,云南滇池和贵州草海群体之间、黑龙江方正和安徽滁州群体之间的遗传关系最为密切,它们各自归为一个群体;河南淇河群体为相对独立的一支,它与黑龙江和安徽群体的遗传关系较近;江西彭泽群体与各群体间的遗传关系最远。

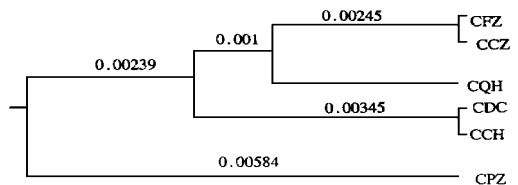


图3 6 个银鲫群体的聚类关系图

Fig. 3 UPG phylogenetic tree of 6 populations of *C. auratus gibelio*

表4 银鲫6个群体间的遗传距离

Tab. 4 The genetic distances among 6 populations of *C. auratus gibelio*

	CPZ	CCZ	CQH	CDC	CFZ	CCH
CPZ	0.0000					
CCZ	0.0066					
CQH	0.0126	0.0049				
CDC	0.0163	0.0069	0.0069			
CFZ	0.0066	0.0000	0.0049	0.0069		
CCH	0.0163	0.0069	0.0069	0.0000	0.0069	0.0000

3 讨论

3.1 银鲫群体的 mtDNA 多态性

本试验所用个体均是随机采样,因此它们之间的差异可能反映了银鲫群体内部的遗传多样性。研究结果显示,6个种群的36个样本中存在7种mtDNA限制性类型(基因型),说明我国的银鲫群体中存在较丰富的mtDNA多态性,这一结果提示mtDNA可作为银鲫种内的分子遗传标记。另从7种限制性种类的分布,我们又可看出各个群体之间虽存在一些内在的联系,也已存在一定程度的地理分化。这一特征或许能为我们追溯银鲫的进化历史提供线索。可以设想,银鲫群体是由同一祖先群体演化而来,出现频率高的限制性类型(如类型3)可能是该祖先群体中存在的主要克隆。

3.2 银鲫群体间亲缘关系的探讨

黑龙江方正银鲫是我国最著名的银鲫群体,因此自发现其它地区的银鲫群体后,人们便着手探讨它们与方正银鲫之间的亲缘关系与变异程度。通过对江西彭泽鲫、安徽滁州鲫、河南淇河鲫和云南滇池鲫等(未见有草海鲫)与黑龙江方正银鲫进行形态特征、细胞遗传和生化遗传方面的比较研究,发现它们与黑龙江的方正银鲫形态相似、染色体众数相近分别为166、160、162和162[杨兴棋等1992,张克俭等1995,孙兴旺1986,咎瑞光1982,单仕新和蒋一硅1985],但并不完全一致,且染色体组型及染色体臂数也有较大差异。同工酶分析的结果又表明方正银鲫与河南淇河鲫的酶谱较相似[楼允东等1989],而与滇池高背鲫的差异较明显[黄生民等1988]。但仅凭这些资料,仍很难确定方正银鲫与其它群体间的系统发育关系,至于银鲫各群体间的亲缘关系更是不得而知,因为我们缺乏有关银鲫类的较完整的种群间的系统发育研究资料。为了更好地开发利用银鲫这一重要的种质资源,我们在细胞遗传学和生化遗传学研究的基础上,采用分子遗传学技术,对其不同地理种群银鲫的遗传结构及其多样性进行比较系统的研究。从本文mtDNA RFLP分析结果可以看出,6个银鲫种群中,贵州草海与云南滇池群体的限制性类型分布一致,因而它们之间没有发生显著的遗传分化,归为一群;而黑龙江方正与安徽滁州群体的mtDNA虽有差异,但在统计学上并不显著,因此它们之间的亲缘关系也非常密切,归为另一个群体;河南淇河群体相对独立,从UPG聚类关系图可以看出,该群体与黑龙江方正和安徽滁州群体的遗传关系较近;而江西彭泽群体与各群体的遗传关系最远。仅就方正银鲫而言,它与滁州群体归为一群,而后依此与淇河群体、滇池和草海群体、彭泽群体相

聚,表明方正群体与滁州群体的遗传关系最为密切,而与彭泽群体的亲缘关系最远。

彭泽鲫原产江西彭泽县的丁家湖、芳湖和太白湖。现在丁家湖早已不存在了,芳湖和太白湖也已成了人工放养的湖泊,每年要起捕,再人工放养鱼种。即使这些湖中有野生的,数量也极少,难于捕到和区别。我们所用的彭泽鲫是经过九江市水产研究所多代选育的。根据杨兴棋等[1992]研究彭泽鲫(人工选育至5代)在体型、体色、脊椎骨数和侧线鳞数等可数性状来看,彭泽鲫与银鲫的分类特征相符,而从群体的体长/体高、体长/头长和体长/尾柄高等可量性状比值来看,彭泽鲫与银鲫之间存在着比较明显的差别。另外,彭泽鲫的背部与鳍条呈青黑色,明显深于方正银鲫,眼巩膜黑色素较多,呈黑色,而方正银鲫则呈灰白色。彭泽鲫与方正银鲫的肝脏形态也有明显区别,方正银鲫的肝脏肥大而柔软,呈淡褐色,而彭泽鲫的肝脏相对较小而致密,呈褐红色。由于彭泽鲫的形态特征在可数性状方面与银鲫相似,而在可量性状与某些质量性状方面又与银鲫有区别,因此有必要对其种群遗传结构、地理分布及起源进化作深入的研究。本研究从分子生物学角度,表明彭泽鲫与方正银鲫的亲缘关系较远,这与上述形态学上的差异相一致。

通过本文的研究,初步了解了银鲫种群遗传多样性及各种群间的亲缘关系。更为复杂的一些问题如银鲫种群的起源等,还有待收集更多的资料后进一步探明。

本研究为“九五”农业部重点科研项目,编号:渔95-A-96-01-01。在采样过程中,得到上海水产大学渔业学院张克俭、安徽省滁州市水产局、江西省九江市水产研究所傅永进、河南省水产研究所张四瑞、胥昌红和吴贯东、中国科学院昆明动物研究所王蕊芳和黄顺友、贵州省水产研究所于涛和张宇以及黑龙江水产研究所沈俊宝和孙孝文等老师、领导和校友的大力支持;农业部上海水产大学水产增养殖生态生理重点开放实验室提供部分仪器设备;本院张敏同志协助拍摄电泳照片。在此一并致谢。

参 考 文 献

- 孙兴旺. 1986. 淇河鲫的生物学特征. 淡水渔业, (2): 5~8.
- 张亚平. 1992. 动物线粒体DNA多态性的研究概况. 动物学研究, 13(3): 289~296.
- 张克俭, 万全, 李公行等. 1995. 滁州鲫染色体组型的研究. 中国水产科学, 2(4): 8~15.
- 单仕新, 蒋一珪. 1985. 银鲫染色体组型研究. 水生生物学报, 12(4): 381~384.
- 杨兴棋, 陈敏容, 俞小牧等. 1992. 江西彭泽鲫生殖方式的初步研究. 水生生物学报, 16(3): 277~283.
- 管瑞光. 1982. 滇池两种类型鲫鱼的性染色体和C带核型研究. 遗传学报, 9(1): 32~39.
- 黄生民, 秦长庚, 潘淑英等. 1988. 滇池高背鲫和方正银鲫酯酶、乳酸脱氢酶同工酶的比较研究. 动物学研究, 9(1): 69~78.
- 楼允东, 张英培, 翁忠惠等. 1989. 淇河鲫鱼细胞遗传学和同工酶的初步研究. 水产学报, 13(3): 254~258.
- Bernatchez L, Guyomard R, Bonhomme F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1: 161~173.
- Bernatchez L, Glemet H, Wilson C C. et al. 1995. Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can J Fish Aquat Sci*, 52: 179~185.
- Bernatchez L, Osinov A. 1995. Genetic diversity of trout (*Genus salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*, 4: 285~297.
- Billington N, Danzmann R G, Hebert P D N, et al. 1991. Phylogenetic relationships among four members of stizostedion (percidae) determined by mitochondrial DNA and allozyme analyses. *J Fish Bio* 39(Supplement A): 251~258.
- Brown W M. 1983. In: Evolution of gene and proteins. Nei M, Koehn R K, eds. Sunderland. 62~88.
- Cronin M A, Spearman W J, Wilmot R L, et al. 1993. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus*

- tshawytscha) and chum salmon (*O. keta*) Detected by Restriction Enzyme Analysis of Polymerase Chain Restriction (PCR) products. *Can J Fish Aquat Sci* 50: 708 ~ 715.
- Hall H J, Nawrocki L W. 1995. A rapid method for detecting mitochondrial DNA in the brown trout, *Salmo trutta*. *J Fish Bio*, 46: 360 ~ 364.
- Lu G Q, Li S F, Bernachez L. 1997. Mitochondrial DNA diversity, population structure and conservation genetics of four native carps within the Yangtze River, China. *Can J Fish Aquat Sci* 54(1): 47 ~ 58.
- Nei M, Li W H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(10): 5269 ~ 5273.
- Park L K, Brainard M A, Dightman D A, et al. 1993. Low levels of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Marine Biology and Biotechnology*, 2(6): 362 ~ 370.

A STUDY ON MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHIS AMONG SIX GEOGRAPHICAL POPULATIONS OF *CARASSIUS AURATUS GIBELIO* IN CHINA

YAO Ji-Hua LOU Yun-Dong JIANG Yong
(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT In six geographical populations of *Carassius auratus gibelio*, the ND 5/6 region (approximately 2.5Kb) of mtDNA genome have been amplified by the polymerase chain reaction (PCR), and the products were examined using restriction fragment length polymorphism (RFLP). 11 electrophoresis patterns and 7 haplotypes (genotypes) have been observed. Based on the genetic distances, the UPG molecular phylogenetic tree of the populations was constructed. The results indicate that the six populations of the *C. auratus gibelio* can be incorporated into four populations, namely, the Heilongjiang and Anhui, the Henan, the Yunnan and Guizhou, and the Jiangxi. The first is the closest to the third. The Henan is much closer to the Heilongjiang and Anhui. The farthest is between the Jiangxi and the other populations.

KEYWORDS *Carassius auratus gibelio*, Population, mtDNA, RFLP