

长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究

张四明 汪登强 邓 怀 余来宁

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘要: 采用 PCR 技术进行了长江中游鲢和草鱼四个地理群体的线粒体 DNA (mtDNA) 限制性片段长度多态性 (RFLP) 的研究。四个地理群体包括长江中游的湖北嘉鱼和江西瑞昌两个地理群体, 长江中游的两大支流汉江和湘江群体。PCR 技术扩增出 mtDNA ND5-ND6 基因, 选用 10 种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切。从鲢中共检出 18 种单倍型, 在草鱼中没有发现多态现象, 只有一种单倍型存在。进一步地证实了长江鲢的遗传多样性比草鱼的要丰富得多, 与这两种鱼类在长江现有生物量成反比的反常现象。

关键词: 鲢; 草鱼; 线粒体 DNA 变异; PCR-RFLP; 遗传多样性; 长江

中图分类号: S 965.112 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002) 02-0142-006

被誉为我国 ‘四大家鱼’ 的青草鲢鳙是我国淡水渔业中最重要的养殖对象, 在这四种养殖种类中尤以鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 最重要。长江是我国淡水渔业的摇篮, 是我国 ‘四大家鱼’ 天然资源的重要产地。尽管 ‘四大家鱼’ 在珠江和黑龙江水系亦有分布, 但其养殖性能不如长江水系^[1]。因此, 保护长江水系 ‘四大家鱼’ 的遗传资源对我国淡水渔业持续稳定地发展非常重要。从遗传结构和遗传多样性的角度探讨遗传资源的现状, 科学地制定种质资源保护和开发计划是近年来国内外学者普遍关注的课题。迄今为止, 尽管已积累一些关于长江水系鲢和草鱼群体遗传变异研究资料^[1-8], 但尚待进一步地积累和深入。

本文运用 PCR 技术对长江中游四个地理群体的草鱼与鲢线粒体 DNA (mtDNA) 进行了限制性片段长度多态性 (RFLP) 的研究, 以期阐明其遗传结构和遗传多样性问题

1 材料和方法

1.1 材料 鲢和草鱼样本来源于长江水系的湖北嘉鱼江段, 江西瑞昌江段, 湖北丹江口水库和长沙 ‘四大家鱼’ 原种场。其中丹江口水库和长沙 ‘四大家鱼’ 原种场鲢和草鱼均分别来源于汉江和湘江。

1.2 总 DNA 的提纯 参照张四明等方法进行^[9]。

1.3 PCR-RFLP 引物序列和 PCR 扩增条件 PCR 扩增部位是 mtDNA ND5/6 基因, 约

2500bp, 扩增引物来源于 Park 等^[10], 其引物序列如下: C-Glu, 5' CAA CGG TGG TTC TTC AAG TC 3'; C-leu3, 5' GGA ACC AAA AAC TCT TGG TGC AAC TCC 3'。

PCR 扩增反应条件是, 10 × Buffer 5 μL, dNTP (1 mmol/L) 2 μL, Taq DNA 酶 (2U/μL) 1.25 μL, 引物 (10 μmol/L) 1.6 μL/ 每种, 加适量模板 DNA 2 μL, 反应总体积为 50 μL。PCR 反应条件, 94 30s, 55 30s, 72 2 min 30s, 35 个循环, 在正式循环前, 95 预变性 4 min 30s, 循环完毕后, 72 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物的酶切方法 所用限制性内切酶(简称内切酶)名称及识别序列如下: *Rsa* [GTAG], *Hae* [GGCC], *Hinf* [GANTC], *Hpa* [CCGG], *Dde* [CTNAG], *Taq* [TCGA], *Nci* [CC(C/G)GG], *Alu* [AGCT], *Ava* [GG(A/T)CC], *Hinc* [GT(T/C)(A/T)AC]。

在进行 PCR 产物酶切时, 每管加 10 μL 的 PCR 产物, 1.5 μL 的酶缓冲液, 2—3U 的内切酶, 加双蒸水至 15 μL。按厂家推荐的最佳反应温度分别进行酶切反应, 反应在水浴条件下进行 5 h 左右。

1.5 PCR 产物的电泳分离 酶切后的 PCR 产物在 90 伏电压条件下用 2% 的琼脂糖凝胶电泳 1.5 h。紫外灯下拍照。

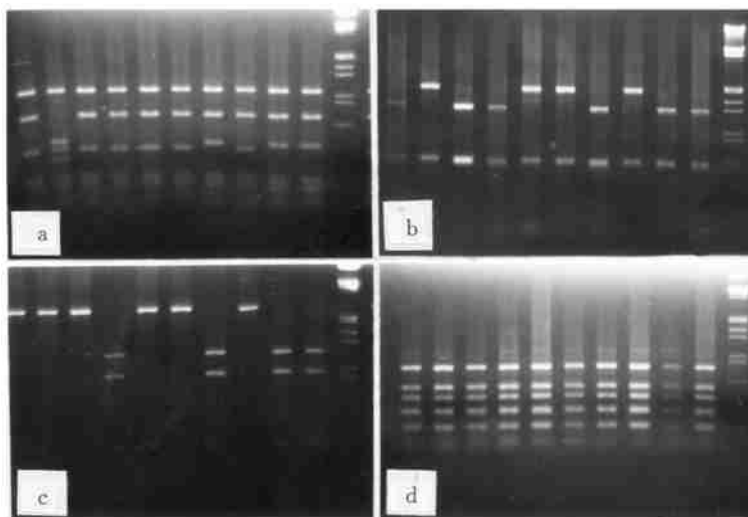


图 1 不同内切酶对鲢和草鱼 mtDNA ND5/ND6 基因片段酶切后的电泳图
a、b、c 分别是内切酶 *Rsa*、*Dde*、*Nci* 在鲢的酶切图谱, d 是内切酶 *Dde* 在草鱼的酶切图谱。每幅图的最右边是 Marker DNA λ (*EcoRI* + *HindIII*)。

Fig. 1 Electrophoretic patterns of mtDNA ND5/ND6 genes digested by different restriction endonucleases in silver carp and grass carp

a, b and c are electrophoretic patterns digested by *Rsa*, *Dde* and *Nci* respectively in silver carp;
d is electrophoretic pattern digested by *Dde* in grass carp. The rightest line in each profile is marker DNA λ (*EcoRI* + *HindIII*)

2 结果

2.1 mtDNA PCR-RFLP 的扩增反应

由于扩增 mtDNA 片段长约为 2500bp 左右,要在较小的片段得到更多的遗传变异信息,宜选用识别四碱基和五碱基序列的内切酶。因此,选用的识别四碱基序列的内切酶有 *Rsa* , *Hae* *Hpa* , *Taq* , *Alu* 和识别五碱基序列的内切酶有 *Hinf* , *Dde* , *Nci* , *Ava* , 识别六个碱基序列的内切酶只一个,即 *Hinc* 。图 1 是 PCR 扩增产物经不同酶切后的部分电泳图。

2.2 鲢和草鱼的 mtDNA 遗传变异

在四个群体中草鱼只检测到一种单倍型,遗传变异为零。但在鲢则检测到 18 种单倍性,各种单倍性的组成见表 1。由表 1 可以看出单倍型 1 出现频率最高,为 26.3%。出现频率次之的是单倍型 5、6、12 和 14,为 7.9%。很多单倍型如单倍型 2、3、4、7、8、9、10、16、17、18 出现的频率很低,只有 1 个样本。同时还注意到除单倍型 1 外,其他几种单倍型都只在一个群体中出现,是否暗示这些单倍型是区分不同群体的遗传标记,目前还无法知道,只有通过大样本的分析方可得知。

表 1 不同鲢单倍型的构成和在各个群体内的分布数
Tab. 1 Constitution and distrubation of mtDNA haplotypes in populations of silver carp

单倍型		个体数				总数目
Haplotype		No. of individuals				
编号	构成	嘉鱼	瑞昌	汉江	湘江	Total
Code	Constitution	Jiayu	Ruichang	Hanjiang	Xiangjiang	
1	AAA AAAAA	4	1	3	2	10
2	AAAABAAA	1	0	0	0	1
3	AAAAABAA	1	0	0	0	1
4	AAAAAABB	1	0	0	0	1
5	ABBBABBB	3	0	0	0	3
6	AACAAAAA	0	3	0	0	3
7	AAAAAABA	0	1	0	0	1
8	AABAAAAB	0	1	0	0	1
9	BCCCAABA	0	1	0	0	1
10	AACAAABA	0	1	0	0	1
11	BCCCAABB	0	0	2	0	2
12	AAACABAB	0	0	3	0	3
13	BDCCAABB	0	0	2	0	2
14	AAAAAAAB	0	0	0	3	3
15	BADCAABB	0	0	0	2	2
16	AACAABAA	0	0	0	1	1
17	AACBAABA	0	0	0	1	1
18	AADCAABA	0	0	0	1	1
总计个体数		10	8	10	10	38
Total						

3 讨论

3.1 mtDNA PCR-RFLP 在群体遗传学中的应用

尽管国外用 mtDNA 遗传变异进行鱼类群体遗传研究有近 20 年时间, 积累了大量的资料, 但是, 在我国应用仍不多。早期的研究集中在鱼类 mtDNA 酶切位点的物理图谱上^[11], 只是近几年才真正地应用于群体遗传多态性研究^[12-15]。我国的 mtDNA RFLP 研究集中在对整个 mtDNA 的 RFLP 研究, 但很多实验室缺乏 DNA 杂交设备和充足的资金, 只有从大量的样本中提纯 mtDNA 用于研究。尽管该方法也是一种可行的方法, 作者早年都是采用该方法进行 RFLP 研究的^[12, 16], 但由于该方法对样品的需求量大, 保存条件要求严格, 因而给野外大样本采集研究带来很大困难。随着 PCR 技术不断的应用和发展, 同时由于鱼类 mtDNA 全序列测定的不断报道, 因此可设计出一些引物用 PCR 技术扩增出某一特定的片段, 然后用内切酶进行扩增片段的 RFLP 研究, 这就是 mtDNA PCR-RFLP 方法。由于 PCR 反应对样品的质和量要求较低, 只要很微量的组织, 无论是保存在低温条件下还是在常温条件下用乙醇保存的样本均可以进行 mtDNA RFLP 研究, 为进行大样本的研究创造条件。该方法采用的内切酶宜以识别 4 或 5 碱基序列的内切酶为主, 否则检测到的遗传变异会很低, 因此花费相对贵些。一般而言, 识别 4 碱基序列的内切酶要比识别 6 碱基序列的内切酶要贵些, 且大多为进口产品。

3.2 鲢和草鱼 mtDNA 基因组的遗传变异

鲢和草鱼样本均来自相同的四个地理群体, 采集的日期也相同。采用的几种内切酶均没有检测到草鱼的遗传变异, 这并不意味着在这四个地理群体草鱼没有遗传变异, 因为研究的样本数量毕竟很有限, 该结果只能说明草鱼比鲢的遗传变异要低得多。作者用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术^[17]得到了与本文相似的结果, 即长江水系的草鱼的遗传变异很低。吴力钊等采用同工酶技术研究认为长江中游武汉江段的鲢和草鱼的多态基因座位比例分别为 14.8% 和 16.7%, 平均杂合度分别为 0.0451 和 0.0739。换言之, 长江中游的鲢群体比草鱼群体的遗传变异低。与本文的结果不一致甚至相反。最近, Lu 等运用 mtDNA RFLP 分析方法对长江水系不同地理群体的鲢和草鱼的研究结果^[8]支持了本文的结果。他们用同样的内切酶分析同样数目的样本, 得出鲢和草鱼核苷酸多样性指数分别为 0.018 和 0.002, 长江水系的鲢遗传变异明显地比草鱼丰富。与本文和我们用 RAPD 得到的结果较一致^[17]。由于 RAPD 和 mtDNA RFLP 技术比同工酶技术灵敏度高, 因此, 关于长江水系鲢的遗传变异高于草鱼是比较可信的。事实上, 草鱼的遗传多样性比鲤的也低^[18]。

长江鲢的生物量明显地比草鱼低得多, 且呈下降的趋势。六十年代草鱼、青鱼、鲢和鳙的鱼苗分别占 40.9%、26.1%、26.1%、6.9%, 八十年代相应的百分比分别为 59.8%、31.6%、3.9%、4.7%^[11]。目前长江水系的鲢和草鱼的生物量的丰欠与发展趋势与遗传多样性的大小成反比是一个很有趣的现象。现代遗传学认为, 物种的遗传变异的大小往往与物种的群体大小成一定的比例关系, 与物种对环境的适应能力密切相关。但近年来长江天然群体的生物量的大小的情况是草鱼的天然产量比鲢要高, 推测其原因可能与目前长江的生态环境更适合于草鱼有关, 草鱼的遗传背景对长江的生态环境产生了短期的高度适

应。草鱼有可能在历史上经历了瓶颈效应, 由一个相对较小的群体演化而来。但是, 从长远地看, 草鱼贫乏的遗传变异可能不利于草鱼种群的健康发展。事实上, 草鱼的抗病力远不及鲢, 在鱼种阶段的成活率很低是众所周知的事实。我国草鱼和鲢的家养化程度基本相同, 排除了抗病力的差异是由于养殖活动引起的遗传多样性丢失所造成。这进一步地说明了草鱼很有可能是一个遗传多样性匮乏的普通物种。

参考文献:

- [1] 李思发, 吴力钊, 王 强, 等. 长江珠江和黑龙江鲢鳙草鱼种质资源的研究[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990
- [2] 吴力钊, 王祖熊. 草鱼同工酶基因座位多态性研究[J]. 水生生物学报, 1988, **12**(2): 116—124
- [3] 吴力钊, 王祖熊. 长江中游草鱼天然群体种群的生化遗传结构和变异[J]. 遗传学报, 1992, **19**(3): 221—227
- [4] 吴力钊, 王祖熊. 长江中游白鲢天然群体种群的生化遗传和变异[J]. 水生生物学报, 1997, **21**(2): 157—162
- [5] 余来宁, 方耀林, 宁宗德, 等. 长江白鲢酯酶同工酶的类型与生长相关性及其在原种保存中的应用[J]. 中国水产科学, 1995, **2**(5): 23—28
- [6] 赵金良, 李思发. 长江干流中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼原种种群分化的同工酶分析[J]. 水产学报, 1996, **20**(2): 104—110
- [7] 夏德全, 杨 弘, 吴婷婷, 等. 天鹅洲通江型长江故道‘四大家鱼’种群遗传结构的研究[J]. 中国水产科学, 1996, **3**(4): 11—19
- [8] Lu G, Li S, Bernatchez L. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within the Yangtze River, China [J]. *Can J Fish Aquatic Sci.* 1997, **54**: 47— 58
- [9] 张四明, 邓 怀, 汪登强, 等. 7 种鲤鱼类亲缘关系的随机扩增多态性 DNA 研究[J]. 自然科学进展, 1999, **9**(9): 188—823
- [10] Park K L, Brainard M A, Dightman D A, Winans G A. Low Levels of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmo (*Onchorhynchus keta*) [J]. *Mol. Mar Biol Biotechnol.* 1993, **2**: 263— 370
- [11] 张四明. 分子生物学技术及其在渔业科学上的应用[J]. 水产学报, 1997, **21**(增刊): 97—108
- [12] 张四明, 龙 华. 湖北淤泥湖团头鲂 mtDNA 限制性片段长度多态性研究[J]. 水产学报, 1996, **20**(4): 289—293
- [13] 张 辉, 董新红, 叶玉珍, 等. 三个三倍体鲫鱼的品系及野鲫 mtDNA 的比较研究[J]. 遗传学报, 1998, **25**(4): 330—336
- [14] 罗 静, 张亚平, 朱春玲, 等. 鲫鱼遗传多样性的初步研究[J]. 遗传学报, 1999, **26**(1): 28—36
- [15] 姚纪花, 楼允东, 江 涌. 我国六个地区银鲫种群线粒体 DNA 多态性研究[J]. 水产学报, 1998, **22**(4): 290—293
- [16] 张四明, 龙 华, 张兴忠. 方正银鲫、白鲫与鲫线粒体 DNA 限制性内切酶酶切比较[J]. 水产学报, 1992, **16**(2): 120—129
- [17] 张四明, 邓 怀, 汪登强, 等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构和遗传多样性的随机扩增多态性 DNA 研究[J]. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 324—330
- [18] 章怀云, 刘荣宗, 张学文, 等. 草鱼和鲤遗传变异的 RAPD 研究[J]. 水生生物学报, 1998, **22**(2): 168—173

MITOCHONDRIAL DNA VARIATIONS OF SILVER CARP AND GRASS CARP IN POPULATIONS OF THE MIDDLE REACHES OF THE YANGTZE RIVER REVEALED BY USING RFLP-PCR

ZHANG Si-ming, WANG Deng-qiang, DENG Hui and YU Lai-ning

(Yangtze River Institute of Fisheries, Chinese Academy of
Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Abstract: Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) are the most important farmed fishes in China. The seedlings of said species for aquaculture have come directly and indirectly from the Yangtze River because germplasm resources of silver carp and grass carp in the Yangtze River is superior to those of other rivers. Therefore, genetic resources of silver carp and grass carp in the Yangtze River play a very important role in fisheries development in China in the long run. In present study, mitochondrial DNA variations were screened in four populations of the middle reaches of the Yangtze River by using PCR-RFLP method. The four populations include two populations, namely, Jiayu and Ruichang which are from the middle reaches of the Yangtze River, and the other two populations, namely, Han River and Xiang River which are from two branches of the middle reaches of Yangtze River. Eighteen haplotypes in silver carp are detected using ten restriction enzymes, including *Rsa* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* I, *Dde* I, *Taq* I, *Nci* I, *Alu* I, *Ava* I and *Hinc* II. However, no genetic variation is noted in grass carp by using same enzymes. Obviously, the genetic diversity in grass carp is much poor than that of silver carp in the middle reaches of the Yangtze River. The genetic diversity and biomass has negative relation, which is not consistent with most cases.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; *Ctenopharyngodon idellus*; mtDNA variation; PCR-RFLP; Genetic diversity; The Yangtze River