

青海湖裸鲤 mtDNA 遗传多样性的初步研究

赵 凯¹, 李军祥¹, 张亚平², 罗 静², 李太平¹, 吴 华¹, 田海宁¹

(1. 青海大学农牧学院动物科学系, 西宁 810003;

2. 中国科学院昆明动物所细胞与分子进化研究开放实验室, 昆明 650223)

摘 要:本文用 *Bcl* I、*Ava* I、*Bam* H I、*Pst* I、*Kpn* I、*Pvu* II 共 6 种限制性内切核酸酶, 分析了 15 尾青海湖裸鲤 mtDNA 的限制性片段长度多态性, 共检测出 20 个酶切位点, 发现 *Bcl* I、*Bam* H I 和 *Pvu* II 三种酶切类型具有多态性。根据不同个体 mtDNA 的酶切类型, 青海湖裸鲤存在 4 种 mtDNA 单倍型, 计算 mtDNA 多态度 π 值为 0.0043, 初步认为青海湖裸鲤在线粒体 DNA 上存在较丰富的群体内变异。

关键词:青海湖裸鲤; mtDNA; 限制性片段长度多态性; 遗传多样性

中图分类号: Q959.46⁺8

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)05-0445-04

Mitochondrial DNA Diversity in Naked Carps in Qinghai-lake (*Gymnocypris przewalskii przewalskii*)

ZHAO Kai¹, LI Jun-xiang¹, ZHANG Ya-ping²,

LUO Jing², LI Tai-ping¹, WU Hua¹, TIAN Hai-ning¹

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Qinghai, Xining 810003, China;

2. Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology the Chinese Academy of Sciences, Yunnan, Kunming 650223, China)

Abstract: An analysis of patterns of cleavage of mtDNA by restriction endonucleases was performed for 15 *Gymnocypris przewalskii przewalskii*. Mitochondrial DNA polymorphisms were detected in the restriction patterns generated by the following 6 enzymes, *Bcl* I, *Ava* I, *Bam* H I, *Pst* I, *Kpn* I, *Pvu* II. Only 3 of them (*Bcl* I, *Bam* H I, *Pvu* II) were found to be polymorphisms. Our results showed that there were 4 mtDNA haplotypes in *Gymnocypris przewalskii przewalskii* and the genetic divergence (π) was 0.0043, which indicated that mtDNA genetic diversity in *Gymnocypris przewalskii przewalskii* is higher.

Key words: Qinghai lake Naked carps; mitochondrial DNA; restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis; genetic diversity

青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii przewalskii* Qinghai Lake Naked Carps)、隶属鲤科 (Cyprinidae)、裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae)、裸鲤属 (*Gymnocypris*)、是青海湖地区重要的经济鱼类。青海湖是我国最大的内陆咸水湖泊, 位于青藏高原东北部, 其特点是海拔高 (湖面海拔 3196m)、气候寒

冷、冰冻期长。湖区生存鱼种类极少, 除少量鳅科 (Cobitidae) 外, 主要为青海湖裸鲤^[1]; 同时由于青海湖裸鲤在当地特殊的经济价值, 近几十年来, 过度捕捞和湖区生态恶化, 使该鱼种数量越来越少, 鱼产量由 1960 年最高 2.8 万吨, 下降到 1995 年 0.75 万吨, 其资源量较开发初期下降了 90%; 且该鱼种繁

收稿日期: 2000-11-20; 修回日期: 2001-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (编号: 39860060)。

作者简介: 赵 凯 (1968), 男 (汉), 青海湟源人, 硕士, 讲师, 研究方向为生物技术与动物遗传育种。电话: 0971-5318030

致 谢: 实验期间得到苟世康、禹一川老师、史宏伟、段子渊、向余劲攻等博士的指导和帮助, 在此表示诚挚的谢意。

殖成活率低,生长缓慢,平均十年左右体重才增加 0.5kg。因此,保护和合理利用这一鱼种,在青海省以及西北地区高海拔高盐碱水系具有非常重要的意义。近几年来,国内外采用细胞遗传学、分子遗传学、生化遗传学等分析手段,对不同物种的遗传特性进行了大量的研究报道,但对青海湖裸鲤的研究却不多,仅有数篇报道^[2,3,4],且都停留在表型和生化标记的态型表述和一般概念定性的描述上。

动物线粒体 DNA(mtDNA)具有分子量小、结构稳定、母性遗传、快速进化等特点,是研究动物系统演化和群体遗传结构的有效标记^[5,6]。同时 mtDNA 限制性片段长度多态(RFLP)分析技术简单快速,可进行大样本的分析,该技术已被用于一些鱼类的遗传研究^[7,8,9],但关于裸鲤属 mtDNA 的研究尚未见报道。本试验对青海湖裸鲤进行 mtDNA 的 RFLP 分析,旨在从分子遗传学角度检验该鱼种群体核外基因组的遗传多样性,为合理利用和保护青海湖裸鲤天然资源提供新的资料。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

从青海湖鱼场随机采取青海湖裸鲤新鲜肝脏 15 份,低温保存。

1.2 mtDNA 提取和酶解

按王文等^[10]碱变性法提取 mtDNA。酶解反应总体积为 20 μ l,其中含 2 μ l 相应的 10 \times Buffer,酶量 6~10U,mtDNA 2.0 μ g,其余加超纯水,37 $^{\circ}$ C 保持 8h。限制性酶采用罗静等^[11]对鲤科鲫属研究中多态性理想的 *Bcl* I、*Ava* I、*Bam*H I、*Pst* I、*Kpn* I、*Pvu* II 六种类型。所有内切酶、Buffer 均购自华美生物工程公司。酶切结果用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,Stratagene Eagle II 自动成像仪上成像。

1.3 数据处理

以 λ DNA / *Hind* III + *Eco*R I 作为分子量标记,用 Nei 和 Li^[11]片段法计算各种单倍型间的片段相似系数 F 和序列差异度(遗传距离)G。

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad G = 1 - \{[-F + (F^2 + 8F)^{1/2}] / 2\}^{1/r}$$

其中, N_{xy} 是 x、y 两类型间共有的酶切片段数, N_x 、 N_y 分别是 x、y 类型的片段总数,r 为限制性内切酶识别序列的碱基数。

根据类型间的遗传距离,计算群体的 mtDNA 核苷酸歧异度 π 值。

$$\pi = \sum A_x A_y G_{xy}$$

A_x 是第 x 种限制性类型在群体中所占的比例, A_y 是第 y 种类型所占的比例, G_{xy} 是 x、y 两类型间的遗传距离。

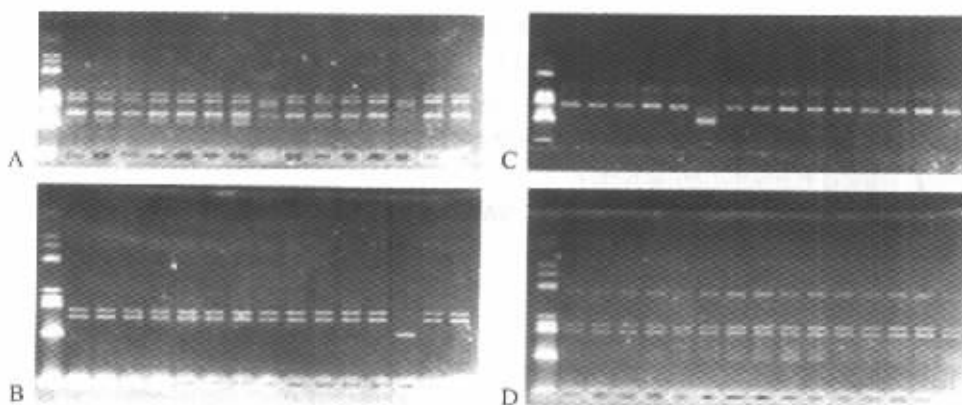


图 1 青海湖裸鲤 mtDNA 的 *Bam*H I (A)、*Bcl* I (B)、*Pvu* II (C) 和 *Ava* I (D) 酶切图谱

Fig. 1 Qinghai lake Naked carps mtDNA *Bam*H I (A), *Bcl* I (B), *Pvu* II (C) and *Ava* I (D) digestion patterns

2 结果与分析

图 1 中,A、B、C、D 分别是 *Bam*H I、*Bcl* I、

Pvu II、*Ava* I 的酶切图谱。6 种限制性内切酶酶切态型及频率见表 1,在限制性片段长度多态性分析时,共检测出 20 个酶切位点。除 3 个限制酶 *Bam*H

I、*Bcl* I、*Pvu* II 具有两种限制性态性外,*Ava* I 酶切类型为单态,*Pst* I、*Kpn* I 无切点。青海湖裸鲤

mtDNA 的分子大小为 16.3~16.7kb,大小的不同可能是由于电泳及统计上的误差造成。

表 1 限制性内切酶酶切态型及频率

Table 1 Endonuclease morphs and their frequency

内切酶 Endonucleas	态型 Morphs	个体数 Numbers	态型频率 Frequency	识别位点 Site number	酶切片段长度(kb) Restriction fragment length
<i>Ava</i> I	A	15	100	1	16.4
<i>Bcl</i> I	A	14	93.33	4	7.2 5.7 2.2 1.6
	B		6.67	2	12.8 3.9
<i>Bam</i> H I	A	13	86.67	3	7.2 4.9 4.3
	B	2	13.33	3	6.2 5.5 4.9
<i>Kpn</i> I		15		0	
<i>Pvu</i> II	A	14	93.33	4	5.8 4.9 3.0 2.6
	B	1	6.67	3	7.3 5.1 4.0
<i>Pst</i> I		15		0	

6种限制性内切酶在15个个体中,共检出7种限制性态型和4种单倍型。单倍型及频率见表2。与I型相比,II、III型各存在1个限制性态性的差异,IV型存在2个限制性态性的差异;与II型相比III、IV型各存在2个和3个限制性态性的差异;与III型相比IV型存在2个限制性态性的差异。其中I型分布频率最高,为80%。由此可知本试验15个个体有4个母系来源,其mtDNA主要以I单倍型存在。

表 2 各个单倍型的限制性态型

Table 2 Restriction morphs of haplotypes

单倍型 * Haplotypes	<i>Pvu</i> I	<i>Bcl</i> I	<i>Bam</i> H II	<i>Ava</i> I	个体数 Numbers	频率 Frequency
I	A	A	A	A	12	0.80
II	B	A	A	A	1	0.067
III	A	A	B	A	1	0.067
IV	A	B	B	A	1	0.067

四种单倍型间的遗传距离(G)分别为 $G_{I-II} = 0.021$ 、 $G_{I-III} = 0.011$ 、 $G_{I-IV} = 0.035$ 、 $G_{II-III} = 0.038$ 、 $G_{II-IV} = 0.10$ 、 $G_{III-IV} = 0.018$, 计算 mtDNA 多态度 π 值为 0.0043。

3 讨 论

群体中 mtDNA 核苷酸歧异度(π 值)是衡量群体多态程度的重要指标, π 值越大,群体多态程度越高。罗静等^[7]研究云南不同地区鲫鱼低背型和高背型 π 值分别为 0.00059 和 0.00057,认为鲫鱼在核

外基因组上有较丰富的遗传变异。本试验青海湖裸鲤 mtDNA 多态性 π 值为 0.0043,而且仅在 15 尾个体中就检出了 4 种线粒体 DNA 单倍型,可见,青海湖裸鲤自然群体存在较丰富的 mtDNA 多态性,其多态程度明显高于银鲟^[12]和长江中下游的鲢、鳊、草鱼、青鱼^[8],同时也显示该试验在鱼类遗传多样性分析中较灵敏。

青海湖地处青藏高原,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(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^[13]。青海湖裸鲤是高度特化的裂腹鱼中的裸鲤属分布在青海湖地区的唯一鱼种。有关青海湖裸鲤的遗传多态性,已有不同方法研究的报道。从表型特征来看^[2],青海湖裸鲤种内变异性较大,如反映在摄食器官方面的鳃耙数、口的位置和肠的长短等的变异,与其生存环境中食料生物贫乏而形成杂食性的特征相一致,另外体型和体色也有很大的变异性。蛋白质电泳结果表明,青海湖裸鲤存在很高的蛋白质生化多态性,认为青海湖区恶劣的气候条件是导致多态性普遍的原因之一^[3];其乳酸脱氢同工酶谱区带亦多于鲤、鲫等的区带^[4]。本研究直接提供了青海湖裸鲤母系遗传的 mtDNA 分子水平的遗传变异信息,比用其他标记技术具有更重要的意义。其遗传多样性直接反映了高原鱼类的生命进化和适应高原复杂环境的能力。

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。遗传多样性丰富的种群在环境变迁中有较大的适应力,但是过度的开发利用所导致的遗传多样性丧失将危及自身的延续能力,加快物种的濒危。因此,有计划地开发利用青海湖裸鲤资源,或采取异地保护“基因库”的办法,是保持其进化潜力、适应不同生境,以及可持续利用的前提。本试验首次运用 RFLP 技术研究了青海湖裸鲤 mtDNA 多态性,从分子水平上为其群体遗传多样性评估和保护利用提供了新的依据。今后更大范围和更多个体的系统研究,将有助于确定青海湖裸鲤的起源、进化及群体的遗传分化。

参考文献(References):

- [1] 中国科学院兰州地质研究所,中国科学院水生生物研究所,中国科学院微生物研究所等. 青海湖综合考察报告[M]. 北京:科学出版社,1979,54~55.
- [2] 青海省生物研究所. 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,1975,9~18.
- [3] 周虞旭. 青海湖裸鲤前清蛋白、运铁蛋白以及血红蛋白多态性的分析[J]. 高原生物学报,1984,2:125~131.
- [4] 张武学,张才骏,李军祥. 青海湖裸鲤乳酸脱氢酶同工酶的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志,1994,24(3):9~12.
- [5] Vawter L. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock[J]. Science, 1986,234:194~196.
- [6] Brown J R. Mitochondrial DNA length Variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon(Acipenser transmontanus)[J]. Genetics, 1992,132:221~228.
- [7] 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):38~36.
- [8] 李思发,吕国庆, L. 贝纳切兹. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多态性分析[J]. 动物学报,1998,44(1):82~89.
- [9] Mulligan T J, Chapman R W, Brown B L. Mitochondrial DNA analysis of walleye pollock, Theragra chalcogramma, from the eastern Bering Sea and Shelikof Strait, gulf of Alaska[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1992,49:319~326.
- [10] 王文,施立明. 一种改进的线粒体 DNA 提取方法[J]. 动物学研究,1993,14(2):191~198.
- [11] Nei M, Li W H. Mathematical models for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 1979,76:5269~5273.
- [12] 肖武汉,张亚平. 银鲫自然群体线粒体 DNA 的遗传分化[J]. 水生生物学报,2000,24(1):1~10.
- [13] 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线问题[J]. 水生生物学报,1996,20(2):97~103.

欢迎订阅《安徽农业科学》

《安徽农业科学》是由安徽省农业科学院主办的综合性农业学术期刊,双月刊。创刊于1961年。安徽省优秀科技期刊,中国科技论文统计用刊和中国学术期刊光盘版收录期刊。主要刊登全国范围的农、林、牧、副、渔业基础理论和应用研究的学术论文,追踪报道各学科的最新实用的农业科技成果。近年来还相继登载有关高新动态,并及时报道最新技术及边缘科学在农业领域应用的专题报告。

本刊适合农业科研人员、农业院校师生及农村科技工作者阅读。

《安徽农业科学》大16开,8个印张(128页),每期定价8.00元,全年订价48.00元。国内统一刊号CN34-1076/S。国际标准刊号ISSN-0517-6611。各地邮局均可订阅,邮发代号26-20。也可汇款向编辑部订阅。

《安徽农业科学》杂志承办广告业务。

本刊地址:安徽省合肥市农科南路40号(安徽省农科院内)

邮编:230031 电话:0551-5145973

2002年《生物技术》征订启事

《生物技术》杂志是包括生物工程学、微生物学、医药、农林、食用菌、环保及生物学相关领域在内的综合性学术期刊,是我国生物学核心期刊,已被SCI、CA、BA、中国生物学文摘、中国期刊网、方正数据资源系统的国内外重要检索媒体收藏。主要报道国内外生物领域研究的新进展、新技术、新方法和新工艺,指导科研生产,促进科技致富。

主要栏目有“论著”、“综述与讲座”、“技术与方法”、“开发与应用”、“实用新技术博览”等。本刊承揽广告,报价合理,连续刊登特别优惠。

《生物技术》为大16开,双月刊,每期5.50元,全年33元。各地邮局均订阅,邮发代号:14-225,编辑部办理缺刊补订和零售服务。

地址:哈尔滨市道里区兆麟街68号《生物技术》编辑部 邮编:150010

电话:0451-4615121

传真:0451-4614297

E-mail:swjszxxw@163.com

http://www.hljiam.com.cn