

二倍体和四倍体泥鳅线粒体 *ND-5/6* 基因 多态性的 PCR-RFLP 分析

郑鹏飞¹, 张桂蓉¹, 魏开建¹, 邹桂伟², 王卫民¹, 周玲玲¹, 冉伟¹

(1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室/农业动物遗传育种

与繁殖教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所/农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 湖北 荆州 434000)

摘要:采用 PCR-RFLP 分析方法, 对洞庭湖、武汉两地的二倍体和四倍体泥鳅线粒体 DNA *ND-5/6* 基因多态性及 4 个群体遗传变异和遗传关系进行了研究。结果表明, 120 尾泥鳅 mtDNA *ND-5/6* 扩增片段长度均为 2.2 kb; 从 13 种限制性内切核酸酶中筛选出 6 种多态性内切酶 (*Hae* III、*Dra* I、*Rsa* I、*Taq* I、*Hinf* I、*Msp* I), 对扩增产物进行酶切, 共检测到 66 种单倍型。泥鳅群体内单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.7679 ~ 0.9385 和 0.01041 ~ 0.03212; 其中, 洞庭湖二倍体核苷酸多样性最高 (0.03212), 武汉二倍体其次 (0.02452), 二倍体群体内核苷酸多样性高于四倍体。群体间的核苷酸多样性 (π) 大小为 0.02588 ~ 0.04144, 平均值为 (0.031737 ± 0.000005)。群体间的核苷酸歧化距离 (δ) 大小为 0.00462 ~ 0.01617, 平均值为 (0.010659 ± 0.000003); 其中, 武汉二倍体和四倍体之间的核苷酸歧化距离最大 (0.01617), 武汉四倍体和洞庭湖二倍体之间的核苷酸歧化距离最小 (0.00462)。Monte Carlo 模拟 χ^2 检验表明, 4 个群体间的单倍型频率存在极显著差异 ($P < 0.0001$)。UPGMA 聚类分析表明, 武汉四倍体、洞庭湖二倍体和四倍体聚为一支, 亲缘关系较近; 武汉二倍体为单独一支。

关键词: 泥鳅; 二倍体; 四倍体; RFLP; mtDNA; *ND-5/6*

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2011)01-0051-06

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 是一种小型淡水鱼类, 广泛分布于中国、日本、朝鲜等东亚地区, 具有较高营养和药用价值, 是我国重要的名特优养殖对象。研究发现, 泥鳅在不同分布区存在天然多倍体现象, 日本产的泥鳅主要为天然二倍体及少量三倍体, 没有发现天然四倍体 (Arai et al, 1991)。日本学者在泥鳅的染色体倍性操作 (Arai et al, 1993, 1999; Arai, 2001; Yoshikawa et al, 2008)、三倍体的发生 (Zhang & Arai, 1999)、群体遗传学 (Khan & Arai, 2000; Arai 2003; Khan et al, 2005; Arias et al, 2007; Morishima et al, 2008a) 和遗传作图 (Morishima et al, 2008b) 等方面做了较深入的研究。我国的泥鳅主要为天然二倍体和四倍体 (李康等, 1983; 李渝成等, 1987; 印杰等, 2005), 最近又在湖北地

区检测到极少量的天然三倍体和六倍体 (李雅娟等, 2009; Abbas et al, 2009)。近年来, 国内学者对泥鳅 mtDNA 限制性酶切图谱 (李殿香等, 1999)、染色体组型 (李康等, 1983; 李渝成等, 1987; 印杰等, 2005; 李雅娟等, 2009)、倍性检测方法 (高泽霞等, 2007; 周小云等, 2008)、群体遗传变异 (常重杰等, 2001; 单磊等, 2009) 等作了报道。mtDNA 细胞色素 b 序列分析显示, 我国中部地区二倍体和四倍体泥鳅之间存在明显遗传分化 (Yang et al, 2009), 但分布区重叠的二倍体和四倍体泥鳅群体间存在怎样的遗传关系和遗传变异尚不清楚。

线粒体 DNA (mtDNA) 具有结构简单、母系遗传、进化速度快等特点, 已成为鱼类群体遗传变异和系统学等研究的重要标记 (肖武汉和张亚平, 2000)。线粒体 *ND-5/6* 基因是位于细胞色素 b 和 *ND4* 之间的连续区域, 广泛应用于鱼类群体和亚种间的遗传变异研究 (张四明等, 2002; 周建峰等, 2003; 唐首杰等, 2008; Park et al, 1993), 但未见 *ND-5/6* 应用于泥鳅及其多倍体群体遗传的报道。本文旨在通过线粒体 *ND-5/6* 基因的 PCR-RFLP 分析, 对长江中游水系 2 个分布区重叠的二倍体和四倍体泥鳅 mtDNA *ND-5/6* 基因多态性及群体遗传变

收稿日期: 2010-04-16

基金项目: 国家科技基础条件平台专项 (2006DKA30470-002); 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室开放课题 (LFB-CU0708) 资助。

通讯作者: 张桂蓉, 高级工程师, 主要从事鱼类生理生化和遗传育种研究。E-mail: grzhang@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 郑鹏飞, 1984 年生, 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: zhengpf@126.com

异进行比较,为探讨泥鳅多倍体的形成和系统进化提供遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集和倍性鉴定

2007年从湖北省武汉市蔡甸区和湖南省岳阳市洞庭湖采集野生泥鳅120尾,活体带回实验室。采集泥鳅个体血液样品,预处理后采用流式细胞仪测定红细胞DNA相对含量以鉴定其倍性。剪取泥鳅个体的尾部组织,95%乙醇固定后,-40℃保存。泥鳅群体的倍性和样本信息见表1。

表1 泥鳅群体的倍性、样本大小及采集地点

Tab.1 Ploidy, sample size and sampling site of loach populations

群体及倍性	代号	样本数/个	采集地点	地理座标
武汉四倍体	WHT	32	湖北武汉	30°28'N, 114°06'E
武汉二倍体	WHD	32	湖北武汉	30°28'N, 114°06'E
洞庭湖四倍体	DTT	38	湖南岳阳	29°20'N, 113°09'E
洞庭湖二倍体	DTD	18	湖南岳阳	29°20'N, 113°09'E

1.2 基因组DNA提取和PCR扩增

采用常规苯酚-氯仿抽提法从泥鳅尾鳍组织中提取基因组DNA(萨姆布鲁克等,1992)。线粒体ND-5/6基因片段采用引物ND5G(5'-CAACGGTG-GTTCTTCAAGTC-3')和ND6L(5'-GGAAC-CAAAAAGTCTTGGTGCAACTCC-3')进行PCR扩增(Park et al, 1993)。PCR扩增反应体系总体积为50 μL:10 × Buffer(Fermentas),2.0 mmol/L Mg²⁺,0.3 mmol/L dNTPs,2.5U Taq DNA聚合酶(Fermentas),引物各0.2 μmol/L,100 ng模板DNA。PCR循环参数为94℃预变性5 min,94℃变性45 s,54℃退火45 s,72℃延伸2 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR产物的限制性酶切

从13种限制性内切酶中筛选出Hae III、Dra I、Rsa I、Taq I、Hinf I、Msp I(Toyobo和Fermentas)6种多态性的内切酶,对PCR产物进行单酶酶切。酶切反应体系为15 μL:PCR产物5 μL,内切酶2 U,酶切缓冲液1.5 μL,用灭菌双蒸水补足15 μL,按厂家推荐反应温度酶切4~6 h。酶切产物经1.5%琼脂糖凝胶(含EB)电泳,凝胶成像。以100 bp DNA Ladder为分子量标准,采用Quantity One软件(Bio-Rad)确定限制性片段大小。依次用A、B、C等字母来命名每一种酶的限制性酶切图谱类型。

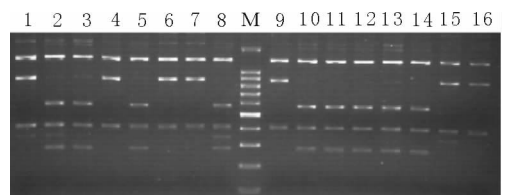
1.4 数据分析

将6种酶对某一个体的限制性酶切图谱类型的代表字母按次序组合为6个字母的编码,表示这一个体的单倍型(haplotype)。利用各内切酶的限制性片段二进制资料建立内切酶文件,利用全部个体RFLP单倍型编码及对应内切酶资料建立单倍型文件,应用REAP软件(McElroy et al, 1991),根据Nei(1987)的方法计算单倍型间的进化距离(d_r)以及群体内的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π),依Nei & Tajima(1981)的方法计算群体间的核苷酸多样性(π)和核苷酸歧化距离(δ)。应用REAP软件的MONTE程序进行10 000次Monte Carlo模拟 χ^2 检验,以判断群体之间单倍型频率的差异显著性。根据群体间的核苷酸歧化距离(δ),用MEGA 4.0软件构建群体的UPGMA聚类图。

2 结果

2.1 RFLP单倍型多样性

经电泳检测,泥鳅mtDNA ND-5/6扩增片段长度约2.2 kb,4个群体间无长度异质性。6种内切酶均有酶切位点,酶切产物呈现较好的多态性(图1)。



M: DNA Ladder (1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); 1~16: 个体编号

图1 武汉二倍体泥鳅群体部分个体mtDNA ND-5/6的TaqI酶切图谱

M: DNA Ladder (1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); 1~16: No. of individuals

Fig. 1 Restriction fragment patterns of mtDNA ND-5/6 for some diploid loach individuals in Wuhan obtained by TaqI digestion

6种酶的酶切片段类型数量分别为12(Hae III)、11(Dra I)、12(Rsa I)、16(Taq I)、25(Hinf I)和8(Msp I)。在4个泥鳅群体120个个体中,共检测到66种单倍型(用1~66表示),不同单倍型在各群体中的分布及出现个体数量见图2。从图2可见,除了武汉四倍体(WHT)3个个体与洞庭湖二倍体(DTD)5个个体共享单倍型3(AABAAA,内切酶顺序依次为Hae III、Dra I、Rsa I、Taq I、Hinf I、Msp I)以外,其余单倍型分别为各泥鳅群体所

独有。在所有单倍型中,第24种单倍型(DEADKA)出现的样本数最多(15),占武汉二倍体(WHD)总个体数的46.88%;另有50种单倍型在所有群体中

分别仅出现1次。采用单倍型之间的进化距离(d_i)对66种单倍型进行聚类分析,表明单倍型进化关系与4个泥鳅群体采集地点之间没有相关性。

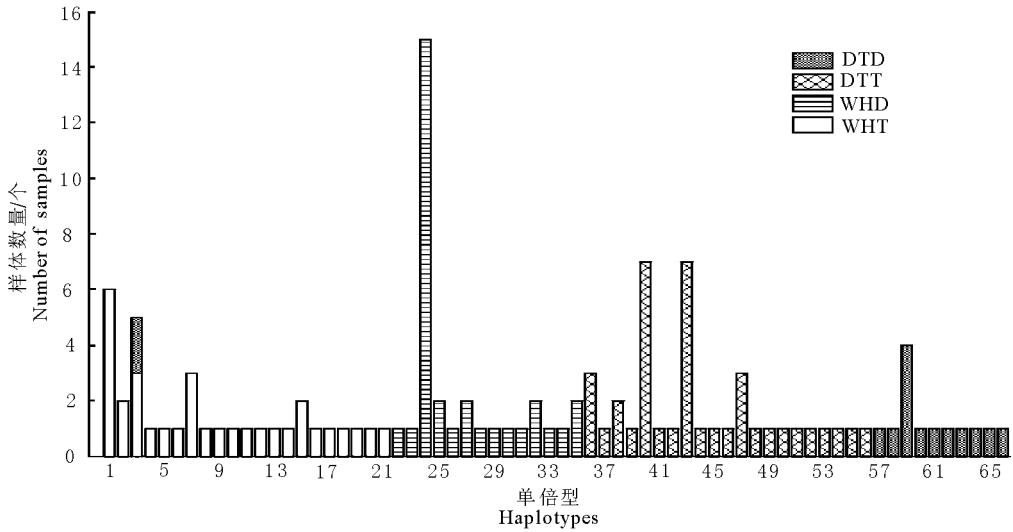


图2 泥鳅4个群体 mtDNA ND-5/6 单倍型的分布及其样本数量

Fig.2 Distribution of loach mtDNA ND-5/6 haplotypes and their number of samples in four loach populations

2.2 遗传变异及系统发育关系

泥鳅4个群体内的遗传变异参数见表2。群体内出现的单倍型数量为11~21个,单倍型占群体样本数的比率为0.4375~0.6563。泥鳅群体内均观测到不同程度的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π),其变化范围分别为0.7679~0.9385和0.01041~0.03212,平均值分别为0.8735和0.02108。2个四倍体泥鳅群体(WHT和DTT)的单倍型多样性高于2个二倍体群体(DTD和WHD),而二倍体群体(DTD和WHD)的核苷酸多样性高于四倍体泥鳅群体(WHT和DTT)。WHT群体的单倍型比率、单倍型多样性均最高,而WHD群体的单倍型比率、单倍型多样性和核苷酸多样性均最低。

泥鳅群体之间的核苷酸多样性(π)和核苷酸歧化距离(δ)见表3。 π 变化范围为0.02588~0.04144,平均值为(0.031737 ± 0.000005); δ 变化范围为0.00462~0.01617,平均值为(0.010659 ± 0.000003),其中,WTD和WHT之间的核苷酸歧化距离最大(0.01617),WHT和DTD之间的核苷酸歧化距离最小(0.00462)。

基于泥鳅群体间的核苷酸歧化距离(δ)构建UPGMA聚类分析如图3所示,各分支上的数值为支长。武汉四倍体(WHT)和洞庭湖二倍体(DTD)群体先聚为一支,再与洞庭湖四倍体(DTT)聚在一起,武汉二倍体(WHD)单独成为一支。Monte Carlo 随

机化 χ^2 检验表明,单倍型频率在4个泥鳅群体之间表现出极显著的异质性($P < 0.0001$)。

表2 泥鳅4个群体内的单倍型数量、单倍型多样性(h)及核苷酸多样性(π)

群体	样本数/个	单倍型数量 ¹⁾ /个	单倍型比率 ²⁾	单倍型多样性(h)	核苷酸多样性(π)
WHT	32	21	0.6563	0.9385	0.01041
WHD	32	14	0.4375	0.7679	0.02452
DTT	38	21	0.5526	0.9179	0.01728
DTD	18	11	0.6111	0.8698	0.03212
均值			0.5644	0.8735	0.02108

注:1)指群体内单倍型出现数量;2)群体内单倍型数量/样本数。

Notes: 1) It indicates number of haplotype occurrence within population. 2) Number of haplotypes/sample size.

表3 泥鳅4个群体之间的核苷酸歧化距离(对角线以下)和核苷酸多样性(对角线以上)

Tab.3 Nucleotide diversity (above diagonal) and nucleotide divergence (below diagonal) among four loach populations

群体	WHT	WHD	DTT	DTD
WHT		0.03363	0.02604	0.02588
WHD	0.01617		0.03202	0.04144
DTT	0.01220	0.01112		0.03142
DTD	0.00462	0.01312	0.00672	

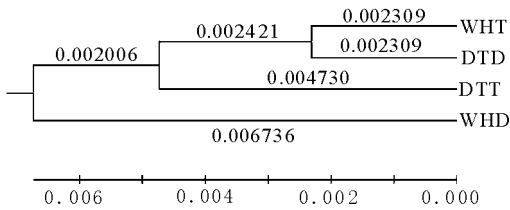


图3 基于核苷酸歧化距离构建的泥鳅4个群体的UPGMA聚类分析

Fig. 3 UPGMA dendrogram based on nucleotide divergence for four loach populations

3 讨论

3.1 单倍型数量比较

线粒体PCR-RFLP分析是研究群体遗传变异的一种经济有效的分子标记方法。张四明等(2002)对长江中游水系鲢和草鱼4个群体mtDNA ND-5/6进行PCR-RFLP分析,其ND-5/6片段长度均为2.5 kb;其中,鲢有18种单倍型,而草鱼只有1种单倍型。本实验对洞庭湖、武汉二倍体和四倍体泥鳅4个群体的PCR-RFLP分析结果表明,在相同引物条件下,2种倍性泥鳅mtDNA ND-5/6片段长度(2.2 kb)小于鲢和草鱼(2.5 kb),但泥鳅、鲢、草鱼ND-5/6扩增片段长度均具有各自的种内同质性;在泥鳅群体中共检测到66种单倍型,与鲢、草鱼相比,泥鳅的单倍型比较丰富。

3.2 遗传多样性比较

据报道,21种无脊椎动物、鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类动物种内的群体间mtDNA遗传变异在0.001~0.087,平均遗传变异为0.028(Avise et al, 1987; Avise, 1994)。本实验中,4个泥鳅群体mtDNA ND-5/6基因呈现不同程度的变异,各群体的核苷酸多样性处于上述21种动物mtDNA遗传变异范围内,其中洞庭湖二倍体泥鳅核苷酸多样性最大(0.03212),其次为武汉二倍体(0.02452),武汉四倍体核苷酸多样性最小(0.01041)。Khan等(2005)对日本11个泥鳅群体mtDNA D-loop区进行了RFLP分析,其中2个群体的核苷酸多样性为0.02476~0.02633,其余群体为0,其平均遗传变异小于本实验结果。洞庭湖二倍体泥鳅遗传多样性大于武汉二倍体,这与微卫星DNA分析结果相一致(单磊等, 2009)。2个二倍体泥鳅群体遗传多样性高于2个四倍体泥鳅群体,这可能与分布区重叠的二倍体和四倍体之间存在生殖隔离有关,四倍体可能因瓶颈效应而具有较低的遗传变异。此外,与长江水系鲢和草鱼不同群体mtDNA RFLP分析结果相

比较,4个泥鳅群体核苷酸多样性平均值(0.02108)大于鲢(0.018)和草鱼(0.002)(Lu & Bernatchez, 1997),同一水系的泥鳅群体比鲢和草鱼群体具有较高的遗传多样性,这与泥鳅人工养殖历史较短,其野生资源受人工繁育等活动的影响相对较小有关。

3.3 核苷酸歧化距离比较

本实验中,泥鳅群体间的核苷酸歧化距离(0.00462~0.01617)与真鲷属(*Pagrus*)2种鱼类的核苷酸歧化距离(0.00402~0.01625)接近(Tabata & Taniguchi, 2000),但其平均核苷酸歧化距离(0.010659)明显小于日本11个泥鳅群体(0.05312)(Khan et al, 2005)。Monte Carlo随机化 χ^2 检验表明,单倍型频率在4个泥鳅群体之间表现出极显著的差异($P < 0.0001$)。因此,长江中游水系不同倍性4个泥鳅群体间存在较大的遗传分化,但遗传分化程度小于日本产的泥鳅,这可能与日本泥鳅分析群体数量较多、采样范围广有关。

在4个泥鳅群体中,武汉二倍体和四倍体之间的核苷酸歧化距离最大(0.01617),武汉四倍体和洞庭湖二倍体之间的核苷酸歧化距离最小(0.00462)。聚类分析表明,4个泥鳅群体聚为2支,武汉四倍体和洞庭湖二倍体亲缘关系最近先聚在一起,再与洞庭湖四倍体聚为一支,而武汉二倍体单独成为一支。武汉和洞庭湖两个采集地的泥鳅并没有按照倍性聚为二倍体和四倍体2个亚群。mtDNA Cyt b序列分析表明,武汉二倍体泥鳅群体和四倍体泥鳅群体之间存在显著遗传分化并按倍性聚为2个亚群,而相同倍性泥鳅群体间没有显著遗传变异(Yang et al, 2009),这反映出不同分布区的泥鳅存在不同的遗传变异。4个泥鳅群体的聚类关系暗示着武汉二倍体泥鳅是一个与其余3个群体遗传分化较大的独特群体,而武汉和洞庭湖的四倍体泥鳅都与洞庭湖二倍体泥鳅存在较近的亲缘关系,这是否意味着2个四倍体群体源于洞庭湖二倍体尚有待进一步研究。武汉、洞庭湖都位于长江中游的泛滥平原,武汉四倍体和洞庭湖二倍体泥鳅各有一些个体共享第3种单倍型,说明它们经由长江发生过基因交流。因此,要阐明我国不同倍性泥鳅之间的遗传分化、系统发育关系和多倍体形成机制,必须采用多种遗传标记对更大范围的群体作进一步的研究。

参考文献

常重杰,周荣家,余其兴. 2001. 两种泥鳅不同群体遗传变异的RAPD分析[J]. 动物学报, 47(1): 89-93.

- 单磊,魏开建,张桂蓉,等. 2009. 长江中下游二倍体泥鳅4个种群的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报, 28(4): 453-458.
- 高泽霞,王卫民,周小云. 2007. 2种鉴定泥鳅多倍体方法的比较[J]. 华中农业大学学报, 26(4): 524-527.
- 李殿香,李传印,戎茜,等. 1999. 泥鳅线粒体DNA限制性酶切图谱[J]. 动物学研究, 20(2): 153-155.
- 李康,李渝成,李敏. 1983. 两种泥鳅染色体组型的比较研究[J]. 动物学研究, 4(1): 75-81.
- 李雅娟,田萍萍,李莹,等. 2009. 中国洪湖不同倍性泥鳅的染色体组型及形态特征比较分析[J]. 大连水产学院学报, 24(3): 236-241.
- 李渝成,李康,蒋建桥,等. 1987. 马口鱼和泥鳅的核型研究兼论鱼类染色体数目多态与分类的关系[J]. 武汉大学学报:自然科学版, (1): 107-112.
- 萨姆布鲁克J, 费里奇E F, 曼尼阿蒂斯T. 著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 1992. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社: 463-466.
- 唐首杰,李思发,蔡完其. 2008. 不同倍性团头鲂群体的线粒体DNA分析[J]. 中国水产科学, 15(2): 222-229.
- 肖武汉,张亚平. 2000. 鱼类线粒体DNA的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 24(4): 384-392.
- 印杰,赵振山,陈小奇,等. 2005. 二倍体和四倍体泥鳅染色体组型比较[J]. 水生生物学报, 29(4): 469-472.
- 张四明,汪登强,邓怀,等. 2002. 长江中游水系鲢和草鱼群体mtDNA遗传变异的研究[J]. 水生生物学报, 26(2): 142-147.
- 周建峰,王忠卫,吴清江. 2003. 鲤鱼3个亚种线粒体DNA ND5/6区段的PCR-RFLP分析及亚种间分子标记的确立[J]. 科学通报, 48(2): 167-170.
- 周小云,李明云,方礼豹,等. 2008. 基于形态特征的泥鳅染色体倍性分析[J]. 华中农业大学学报, 27(5): 644-647.
- Abbas K, Li M Y, Wang W M, et al. 2009. First record of the natural occurrence of hexaploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in Hubei Province, China [J]. Journal of Fish Biology, 75: 435-441.
- Arai K, Matsubara K, Suzuki R. 1991. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 57: 2167-2172.
- Arai K, Matsubara K, Suzuki R. 1993. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Aquaculture, 117: 227-235.
- Arai K, Inamori Y. 1999. Viable hyperdiploid progeny between diploid female and induced triploid male in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Suisan Zoshoku, 47: 489-495.
- Arai K, Taniura K, Zhang Q. 1999. Production of second generation progeny of hexaploid loach [J]. Fisheries Science, 65: 186-192.
- Arai K. 2001. Genetic improvements of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan [J]. Aquaculture, 197: 205-228.
- Arai K. 2003. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: Recent progress and perspective [J]. Folia Biologica, 51: 107-117.
- Arias R L, Morishima K, Arai K. 2007. Genetically diversified populations in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* inferred from newly developed microsatellite markers [J]. Molecular Ecology Notes, 7: 82-85.
- Awise J C, Arnold J, Ball R M, et al. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 489-522.
- Awise J C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution [M]. New York: Chapman and Hall: 511.
- Khan M R, Arai K. 2000. Allozyme variation and genetic differentiation in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Fisheries Science, 66: 211-222.
- Khan M M R, Arai K, Kuroda K, et al. 2005. Genetic variation of Japanese loach inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA [J]. African Journal of Biotechnology, 4(4): 318-325.
- Lu G, Li S, Bernatchez L. 1997. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and conservation genetics of four native carps within the Yangtze River, China [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54: 47-58.
- McElroy D, Moran P, Bermingham E, et al. 1991. REAP: the restriction enzyme analysis package, Version 4.0 [CP]. Department of Zoology, Migratory Fish Research Institute and Center for Marine Studies, University of Maine, Orono, USA.
- Morishima K, Nakamura - Shiokawa Y, Bando E, et al. 2008a. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses [J]. Genetica, 132: 159-171.
- Morishima K, Nakayama I, Arai K. 2008b. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) [J]. Genetica, 132: 227-241.
- Nei M, Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases [J]. Genetics, 97: 145-163.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press.

- Park K L, Brainard M A, Dightman D A, et al. 1993. Low levels of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Onchorhynchus keta*) [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2: 362 – 370.
- Tabata K, Taniguchi N. 2000. Differences between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis [J]. *Fisheries Science*, 66: 9 – 18.
- Yang C T, Cao L, Wang W M, et al. 2009. Comparative and evolutionary analysis in natural diploid and tetraploid weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* based on cytochrome b sequence data in central China [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 86: 145 – 153.
- Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, et al. 2008. Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: a review [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 410 – 414.
- Zhang Q, Arai K. 1999. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Ichthyological Research*, 46: 153 – 161.

(责任编辑 万月华)

PCR-RFLP Analysis on Mitochondrial *ND-5/6* Gene Polymorphisms of Natural Diploid and Tetraploid Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)

ZHENG Peng-fei¹, ZHANG Gui-rong¹, WEI Kai-jian¹, ZOU Gui-wei²,
WANG Wei-min¹, ZHOU Ling-ling¹, RAN Wei¹

1. College of Fisheries, Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization of Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP) analysis was used to investigate mitochondrial *ND-5/6* gene polymorphisms, genetic variations and relationships of four natural diploid and tetraploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) populations from Dongting Lake (DT) and Wuhan city (WH) in China. The results showed that the length of mtDNA *ND-5/6* regions amplified in 120 samples was 2.2 kb. 66 haplotypes were detected using six polymorphic restriction enzymes (*Hae* III, *Dra* I, *Rsa* I, *Taq* I, *Hinf* I, *Msp* I), which were screened from 13 enzymes. The haplotypic and nucleotide diversities within populations ranged from 0.7679 to 0.9385 and from 0.01041 to 0.03212, respectively. The nucleotide diversity of DT diploid was the largest (0.03212), and that of WH diploid was the second biggest (0.02452). Of the four loach populations, the nucleotide diversities of two diploid populations were larger than those of two tetraploid populations. The nucleotide diversity (π) among four populations ranged from 0.02588 to 0.04144, with a mean of (0.031737 ± 0.000005) and nucleotide divergence (δ) ranged from 0.00462 to 0.01617, with a mean of (0.010659 ± 0.000003). Of the four populations, the nucleotide divergence between the WH diploid and WH tetraploid populations was the highest (0.01617), and the nucleotide divergence between the WH tetraploid and DT diploid populations was the lowest (0.00462). The contingency χ^2 test with Monte Carlo simulations revealed a highly significant heterogeneity in the haplotype frequencies for four populations ($P < 0.0001$). The UPGMA dendrogram tree, which was constructed based on the nucleotide divergences, showed that WH tetraploid, DT diploid and DT tetraploid populations were clustered into one branch and their relationships were nearer, and the other branch contained only WH diploid population.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; diploid; Tetraploid; RFLP; mtDNA; *ND-5/6*