

长江中游湖泊中黄颡鱼线粒体 DNA 的遗传变异

方耀林^{1,2}, 汪登强¹, 刘绍平¹, 伍刚¹, 廖伏初³, 陈大庆^{1,2}

(1. 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 3. 湖南省水产科学研究所, 湖南 沅江 413100)

摘要:运用 mtDNA PCR-RFLP 技术对位于长江中游的洞庭湖、涨渡湖、长湖黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)自然群体的种群遗传结构进行比较分析。PCR 技术扩增出黄颡鱼 mtDNA NDI/2 基因, 选用 8 种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切, 3 个群体的黄颡鱼共检出 15 种单倍型, 单倍型间的遗传距离为 0.20%~2.08% (0.813 5% ± 0.409 5%)。各不同群体的单倍型在系统树上有部分交叉, 虽然不同群体在各单倍型中出现的频率有所不同, 但每个群体都和其他群体存在共有的单倍型。尽管单倍型的分布或结构有所不同, 但种群间的遗传距离不大, 与通江型湖泊相比, 两个阻隔型湖泊间的遗传距离更为接近。

关键词:长湖; 洞庭湖; 涨渡湖; 黄颡鱼; 遗传多样性

中图分类号:Q959.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)01-0056-06

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)隶属鲶形目(Siluriformes)、鲶科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus* Bleeker), 是我国淡水名优经济鱼类, 广泛分布于除西部高原和新疆外各水系, 特别是长江中下游的湖泊、溪流等水域中^[1-2]。近 30 年来, 由于水利建设, 过度捕捞及环境污染等原因, 黄颡鱼的天然资源逐年减少。随着近几年黄颡鱼市场需求量日益加大, 其人工养殖和繁殖开始无序发展起来, 因此, 保护黄颡鱼野生群体的遗传资源, 规范黄颡鱼的人工繁殖已日显重要。遗传背景的研究是种质资源保护基础, 目前有关黄颡鱼 mtDNA 遗传变异的研究主要涉及鲶科鱼类的系统发育和分子分类^[3-5]。有关黄颡鱼种群遗传结构的研究仅有蛋白质水平和随机扩增多态 DNA(RAPD)遗传变异的报道^[6-8]。本研究以长江流域内洞庭湖、涨渡湖和长湖 3 个大中型湖泊中的黄颡鱼为材料, 运用 mtDNA PCR-RFLP 技术对黄颡鱼种群遗传结构进行研究, 以期为黄颡鱼的种质资源评估和种质资源保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品来源和数量

黄颡鱼 42 尾, 分别取自湖南岳阳洞庭湖野生群

体 14 尾, 湖北新洲涨渡湖野生群体 13 尾, 湖北荆市长湖野生群体 15 尾。其中洞庭湖是迄今为止长江中下游地区 3 个通江型湖泊之一; 涨渡湖是世界自然基金会长江项目拟定的恢复江湖联系的湖泊之一, 并在最近几年开展了通过灌浆纳苗等措施恢复渔业资源的工作; 长湖目前不通江。

1.2 总 DNA 的提取

取鳍条少许剪碎, 加 400 μ L 裂解液、10 μ L 蛋白酶 K(10 mg/mL), 置 50 $^{\circ}$ C 水浴 4 h。按常规酚抽提法提取基因组 DNA。

1.3 PCR-RFLP 引物序列和扩增条件

PCR 扩增部位是 mtDNA NDI/2 基因(NADH 脱氢酶亚基 1 和 NADH 脱氢酶亚基 2 基因), 所用引物序列如下: PL, 5' ACG TGA TCT GAG TTC AGA CCG GAG TAA TC 3'; PH, 5' GAG AAG AAT CAG CGT GTG ATT GTC ACA GG 3'。

PCR 反应体系为: 反应缓冲液 (1 $\times$ 10⁵ μ L), dNTP(10 mmol) 0.5 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 2 μ L/每种, 2 个单位 TaqDNA 聚合酶, 适量模板 DNA 2 μ L, 总反应体积为 50 μ L。PCR 反应共 35 个循环, 每循环包括 94 $^{\circ}$ C 50 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min。开始循环前 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 结束后于 72 $^{\circ}$ C 保温 6 min。

收稿日期: 2004-02-13; 修订日期: 2004-07-27。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371105); 世界自然基金资助项目(N162)。

作者简介: 方耀林(1979-), 女, 副研究员, 主要从事淡水鱼类种质资源与生物技术研究。

通讯作者: 陈大庆。Tel: 0716-8212277-3046。E-mail: chdq@yfi.ac.cn

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: *Hae* III [GGCC], *Hha* I [GCGC], *Afa* I [GTAG], *Msp* I [CCGG], *Ava* II [GG(A/T)CC], *Nci* I [CC(C/G)GG], *Dde* I [CTNAG], *Dpn* II [GATC]。

在进行PCR产物酶切时,每管加10 μ L的PCR产物,2 μ L的酶缓冲液,1 U的内切酶,加双蒸水至20 μ L。按厂家推荐的反应温度分别进行酶切反应,反应在水浴条件下进行6~8 h。酶切后的PCR产物用2%琼脂糖凝胶于80 V电压下电泳2 h,紫外灯下拍照。

1.5 数据分析

遗传距离的计算按Nei和Li提出的片断法进行,并计算衡量群体内多态程度的 π 值^[9]。

单倍型间的片断共享度: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中, N_{xy} 是X、Y两类型间共有的片断数, N_x 是X类型的片断总数, N_y 是Y类型的片断总数。

利用F得出两个类型间的遗传距离:

$$P \approx 1 - [(-F + (F^2 + 8F)^{1/2}) / 2]^{1/2}$$

在一个群体(A)内,其mtDNA多态度由核苷酸多样性指数(π 值)来衡量, $\pi_A = \sum A_i A_j P_{ij}$, A_i 是第*i*种限制性类型在A群体中所占的分数, A_j 是第*j*种类型所占的分数, P_{ij} 是*i*、*j*两类型间的遗传距离。

任意两群体间的平均mtDNA多态度为:

$$\pi_{AB} = \sum A_i B_j P_{ij}$$

根据 π_A 和 π_{AB} ,可得出任意两群体间的净遗传距离: $P_{net} = \pi_{AB} - (\pi_A + \pi_B) / 2$

用PHYLP 3.5c构建UPGMA系统树。

2 结果

2.1 mtDNA PCR-RFLP的扩增反应

由于扩增mtDNA片断长约3 kb,要在较小的片断得到更多的遗传信息,宜选用识别四碱基和五碱基序列的内切酶^[10]。选用的识别四碱基序列的内切酶有*Hae* III、*Hha* I、*Afa* I、*Msp* I、*Dpn* II,识别五碱基序列的内切酶有*Ava* II、*Nci* I、*Dde* I。其中*Dpn* II、*Hae* III、*Afa* I、*Msp* I、*Nci* I、*Dde* I检测到多态。图1是涨渡湖黄颡鱼mtDNA PCR扩增产物经*Dpn* II酶切后的部分电泳图。

2.2 黄颡鱼3个自然群体的mtDNA的遗传变异

3个群体42尾黄颡鱼共检测到15种单倍型,

利用单倍型的遗传距离构建的单倍型间的UPGMA树及15种单倍型在各群体中的分布见表1(表中的DH、ZH、CH分别代表洞庭湖、涨渡湖和长湖黄颡鱼群体)。由表1可以看出,单倍型HX1出现频率最高,为40.47%;出现频率次之的是单倍型HX2,为9.52%;一些单倍型如HX5、HX6、HX7、HX8、HX10、HX12、HX14和HX15的出现频率很低,只有1个样本。除3个群体共有单倍型HX1外,涨渡湖和洞庭湖共有单倍型HX3,涨渡湖和长湖共有单倍型HX11、HX13,洞庭湖和长湖共有单倍型HX2、HX4和HX9,其他几种单倍型都只在一个群体中出现。

根据Nei和Li^[9]的方法计算出的15种单倍型间的遗传距离列于表2。单倍型的遗传距离为0.20%~2.08%,单倍型HX1和HX7间的遗传距离最小,亲缘关系最近;单倍型HX6和HX15间的遗传距离最大,亲缘关系最远。群体内多态度 π 值为:涨渡湖群体0.2162%,洞庭湖群体0.2314%,长湖群体0.1961%。

根据群体间的多态度及单倍型在群体中的分布,求出3个群体之间的净遗传距离分别为:洞庭湖-涨渡湖:0.3057%;洞庭湖-长湖:0.2529%;涨渡湖-长湖:0.2143%。3个群体遗传关系的聚类图见图2(图中的DH、ZH、CH分别代表洞庭湖、涨渡湖和长湖黄颡鱼群体)。

3 讨论

3.1 涨渡湖黄颡鱼的遗传多样性

动物mtDNA具有母系遗传、闭环双链、分子量小及进化速度较快等特点,常被用于物种分子系统进化、种系划分、遗传多样性等研究。在本研究的3个黄颡鱼群体中,8种限制性内切酶对其ND1/2基因的酶切结果,有6种酶可检测到多态,总共42个个体中,检测到15种单倍型,其多态程度高于我国广泛分布的鲫、鲤以及长江中下游的鲢、鳊、草鱼和青鱼^[10-12]。

遗传多样性是指生物种内和种间的遗传变异度,是生物适应环境与进化的基础^[13]。单倍型之间的遗传距离和多态度 π 值是衡量一个物种或群体的mtDNA变异程度的两个重要指标^[14]。在3个黄颡鱼群体中,检测到的15种单倍型间的遗传距离为0.20%~2.08%(0.8135%±0.4151%),位于一些淡水鱼类mtDNA种内变异较高的范围内,属

种内变异较大的物种^[15]。由于黄颡鱼的养殖业是近几年才发展起来的,所以一直以来黄颡鱼都生活于自然状态,较少的人工干预可能是保持黄颡鱼目

前遗传多样性丰富的原因之一。而传统养殖品种的遗传多样性贫乏可能与它们广泛的人工养殖和无节制的推广放养有极大的关系。

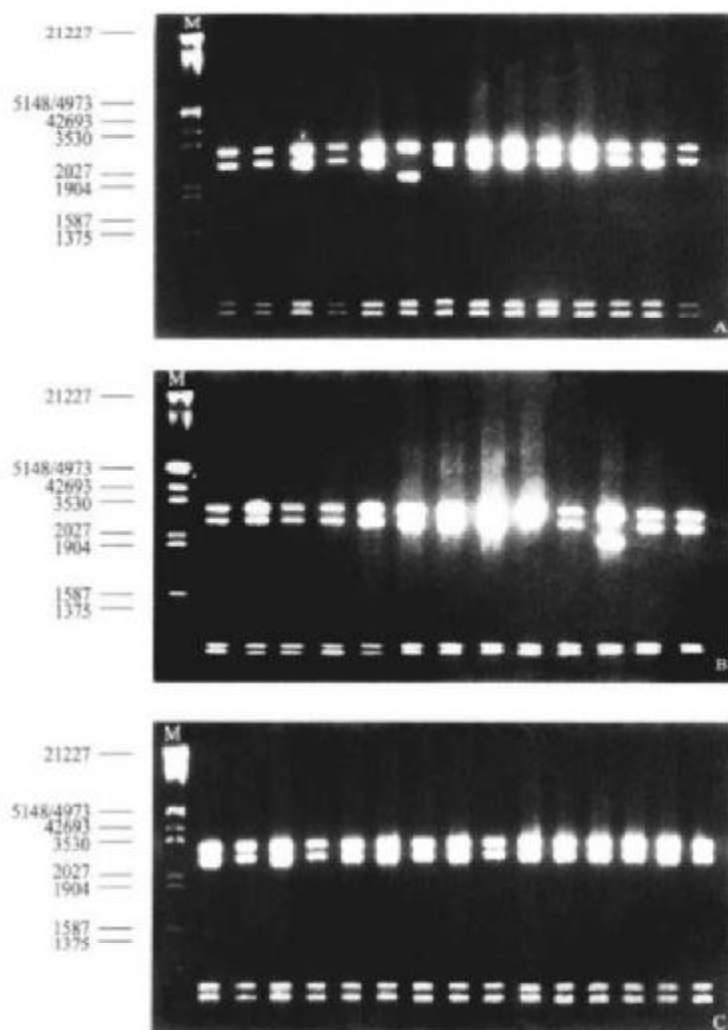


图1 *Dpn II* 对黄颡鱼 mtDNA NDI 和 ND2 基因片段酶切后的电泳图

A:洞庭湖群体 B:鄱阳湖群体 C:长湖群体

Fig.1 Electrophoresis graph of NDI and ND2 genes of mtDNA in *Peisotogrus fulvidraco* after cleavage with *Dpn II* (M:DNA/Hin dIII + Eco R I)

A: Dongting Lake B: Zhushu Lake C: Changshu Lake

3.2 黄颡鱼的种群分化

15种单倍型中,有8种为不同的种群所特有,其余几种单倍型或为3个种群或为某2个种群所共有。由于识别4或5碱基序列的内切酶价格昂贵,因此用于本次实验的样本量相对较少,这8种单倍

型是否是区分不同群体的遗传标记,目前还不能下结论,只有通过大样本的分析方可得知。研究结果表明,各不同群体的单倍型在系统树上有部分交叉,虽然不同群体在各单倍型中出现的频率有不同,但每个群体都和其他群体一样存在共有的单倍型。3

表1 黄颡鱼3个自然群体15种单倍型的聚类图、单倍型构成和在各群体内的分布

Tab.1 Clustering graph of fifteen haplotypes and their constitution and distribution in three natural populations of *Pelteobagrus fulvidraco*

UPGMA 树 UPGMA tree	单倍型 Haplotype		个体数 Number			总数目 Total
	编号 No.	结构 Structure	DH	ZH	CH	
	HX11	ABAAAA		2	1	3
	HX1	AAAAAA	4	6	7	17
	HX7	AABAAA	1			1
	HX8	AABAAB	1			1
	HX13	AAAAAB		1	2	3
	HX12	CAAAAA		1		1
	HX14	BAAAAA		1		1
	HX2	AACABA	3		1	4
	HX3	AABCBA	1	1		2
	HX6	BAADAA	1			1
	HX9	AAABAA	1		2	3
	HX4	AAABCA	1		1	2
	HX5	AAAXCA	1			1
	HX10	AACAAA		1		1
	HX15	AACABA			1	1
总计个数 Total			14	13	15	42

注:DH—洞庭湖群体;ZH—洪波湖群体;CH—长湖群体。

Note:DH—Dongting Lake population; ZH—Hongbo Lake population; CH—Changhu Lake population.

表2 黄颡鱼单倍型间的遗传距离

Tab.2 Genetic distance between haplotypes of *Pelteobagrus fulvidraco*

	HX1	HX2	HX3	HX4	HX5	HX6	HX7	HX8	HX9	HX10	HX11	HX12	HX13	HX14	HX15
HX1	0														
HX2	0.0042	0													
HX3	0.0065	0.0022	0												
HX4	0.0042	0.0043	0.0066	0											
HX5	0.0065	0.0066	0.0044	0.0022	0										
HX6	0.0065	0.0112	0.0090	0.0066	0.0044	0									
HX7	0.0020	0.0063	0.0086	0.0063	0.0086	0.0086	0								
HX8	0.0041	0.0086	0.0109	0.0086	0.0109	0.0109	0.002	0							
HX9	0.0021	0.0065	0.0088	0.0021	0.0043	0.0043	0.0041	0.0063	0						
HX10	0.0084	0.0130	0.0155	0.0130	0.0155	0.0155	0.0061	0.0084	0.0106	0					
HX11	0.0042	0.0088	0.0112	0.0088	0.0112	0.0112	0.0063	0.0086	0.0065	0.0130	0				
HX12	0.0042	0.0088	0.0112	0.0088	0.0112	0.0066	0.0063	0.0086	0.0065	0.0130	0.0088	0			
HX13	0.0021	0.0065	0.0088	0.0065	0.0088	0.0088	0.0041	0.0021	0.0042	0.0106	0.0065	0.0065	0		
HX14	0.0021	0.0065	0.0088	0.0065	0.0088	0.0043	0.0041	0.0063	0.0042	0.0106	0.0065	0.0021	0.0042	0	
HX15	0.0130	0.0088	0.0112	0.0134	0.0159	0.0208	0.0106	0.0130	0.0155	0.0042	0.0181	0.0181	0.0155	0.0155	0



图2 黄颡鱼3个群体遗传关系的UPGMA聚类图

Fig.2 UPGMA phylogram of three populations of *Pelteobagrus fulvidraco* based on net genetic distances of populations

个湖均位于长江中游,尽管单倍型的分布或结构有所不同,但种群间的遗传距离不大。遗传距离从大到小依次为涨渡湖与洞庭湖的群体间遗传距离、长湖与洞庭湖之间的遗传距离、涨渡湖与长湖之间的遗传距离。这可能与3个湖所处的地理位置和历史渊源有关。涨渡湖和长湖历史上也通江,3个群体的遗传背景均与长江干流群体密不可分,所以3个群体相互间的遗传距离较小。涨渡湖和长湖由于人为造成江湖隔绝数十年,其黄颡鱼群体基本上处于湖泊定居状态,随着栖息环境发生一些变化,可能会在遗传背景上相应产生改变,加上与长江干流群体间的基因交流不多,使得它们与洞庭湖黄颡鱼之间的遗传距离相对较大。

保护好长江及其流域内各支流和湖泊中鱼类的遗传多样性是我国重要的渔业管理政策。本研究对黄颡鱼 mtDNA 遗传背景、遗传结构及遗传变异水平进行探讨,为黄颡鱼的种质资源评估提供了部分基础资料。但是,要想从遗传多样性的角度全面了解和评估黄颡鱼的种质资源,还需建立包括用同工酶、RAPD、mtDNA-RFLP、微卫星 DNA、DNA 测序和其他相关技术获得结果的分子数据库。

参考文献:

- [1] 成庆泰,郑葆珊.中国鱼类系统检索(上册)[M].北京:科学出版社,1987:213-214.
- [2] 湖北省水生生物研究所鱼类研究室.长江鱼类[M].北京:科学出版社,1976.
- [3] 张燕,张鄂,何舜平.中国鲴科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育分析[J].水生生物学报,2003,27(5):463-467.
- [4] 杨金权,刘楚章.两种鲴科鱼类在长江和珠江流域 Cytb 基因序列变异性分析[J].水生生物学报,2003,27(3):253-257.
- [5] 彭作刚,何舜平,张耀帮.细胞色素 b 基因序列变异与东亚鲴科鱼类系统发育[J].自然科学进展,2002,12(6):596-600.
- [6] 戴凤田,苏锦祥.鲴科 8 种鱼类同工酶和骨骼特征分析及系统演化的探讨[J].动物分类学报,1998,23(4):432-439.
- [7] 刘文彬,陈合格.黄颡鱼不同组织中同工酶表达模式[J].激光生物学报,2003,12(4):274-278.
- [8] 宋平,潘云凤,向筑,等.黄颡鱼 RAPD 标记及遗传多样性的初步分析[J].武汉大学学报(自然科学版),2001,47(2):233-237.
- [9] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10):5260-5273.
- [10] 张四明,江登强,邓怀.长江中游水鲴和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J].水生生物学报,2002,26(2):142-147.
- [11] 罗静,张亚平,朱春玲,等.鲴鱼遗传多样性的初步研究[J].遗传学报,1999,26(1):28-36.
- [12] 李思发,吕国庆.长江中下游鲴科草鱼四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J].动物学报,1998,44(1):82-93.
- [13] 施立明.遗传多样性及其保存[J].生物科学信息,1990,2(1):158-164.
- [14] 李祥龙,张亚平,陈胜偶,等.三羊多态性及其起源分化研究[J].畜牧兽医学报,1999,30(4):313-319.
- [15] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can Fish Aquat Sci, 1991, 48:80-94.

Variation in mitochondrial DNA of *Pelteobagrus fulvidraco* from three lakes in the Middle Yangtze River

FANG Yao-lin^{1,2}, WANG Deng-qiang¹, LIU Shao-ping¹, WU Gang¹, LIAO Fu-chu³, CHEN Da-qing^{1,2}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Hunan Provincial Fisheries Research Institute, Yuanjiang 413100, China)

Abstract: *Pelteobagrus fulvidraco* Richardson is called Huangsang fish in China, belonging to *Pelteobagrus* (Bleeker), Bagridae, Siluriformes. It is one of the famous and excellent economical freshwater fishes in China. The Middle Reaches of the Yangtze River and the attached lakes are the major habitats of this species. During the recent three decades, the natural resources have been over developed year by year owing to reservoir construction, overfishing, environmental contamination, etc. Now the problem of protecting the germplasm resources has been a priority. In this research, mtDNA-PCR technique was applied to make a comparative analysis on genetic structures of the natural populations of Huangsang fish from Dongting Lake (a river-connecting lake located in Yueyang City of Hunan Province), Zhangdu Lake and Changhu Lake (The latter two are located in Wuhan City and Jingzhou City of Hubei Province, respectively. They once connected with the River and are blocked lakes now) in the Middle Reaches of the Yangtze River. ND1 and ND2 genes on mitochondrial DNA were amplified from Huangsang fish by means of PCR technique. Eight restriction endonucleases that could recognize a sequence of 4 or 5 bases were chosen to conduct enzymatic cleavage of PCR products. Six enzymes were detected to be polymorphism. Fifteen haplotypes were detected from 42 individuals sampled from the three populations of Huangsang fish. Their degrees of polymorphism are higher than those of goldfish (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) which are widely distributed in China, and of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), bighead carp (*Aristichthys nobilis*), grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and black carp (*Mylopharyngodon piceus*) which are distributed in the Middle and Lower Yangtze. The genetic distances between any two different haplotypes are from 0.20% to 2.08% ($0.8135\% \pm 0.4151\%$). The haplotypes of the three different populations have partial chiasma in their phylogenetic tree. Although the occurrence of each haplotype in different populations might be different, each population has some common haplotypes with other populations. The π values that express the degrees of polymorphism within the populations are 0.2162% for Zhangdu population (ZH), 0.2314% for Dongting population (DH) and 0.1961 for Changhu population (CH), respectively.

According to the degrees of polymorphism and the distribution of haplotypes in each population, the net genetic distances between any two of the three populations could be found. The net genetic distance between DH and ZH is 0.3057%, between DH and CH is 0.2529, and between DT and CH is 0.2143%. In spite of different distributions and structures of haplotypes, the genetic distances between any two of the three populations are not large. In comparison with the genetic distance between DH and ZH or between DH and CH, the genetic distance between CH and ZH is closer.

Key words: Changhu Lake; Dongting Lake; Zhangdu Lake; *Pelteobagrus fulvidraco*; genetic diversity

Corresponding author: CHEN Da-qing. E-mail: chdq@yfi.ac.cn