

湖北淤泥湖团头鲂 mtDNA^① 限制性片段长度多态性的研究

张四明 龙 华

(长江水产研究所, 荆沙市 434000)

QY59-468

A 摘要 用 BamHI、BglI、BglII、ClaI、DraI、EcoRI、HindIII、KpnI、PstI、PvuII、SacI、ScaI、XbaI 和 XhoI 十四种限制性内切酶对来源于湖北淤泥湖的团头鲂进行线粒体 DNA 限制性片段长度多态性 (简称 mtDNA RFLP) 研究。初步表明 DraI、PvuII、ScaI 和 XbaI 四种限制性内切酶在 mtDNA 上切点呈现不同程度的多态性。共检测到六种母系集团(克隆)。发现一尾团头鲂 mtDNA 分子大小比普通型鱼 mtDNA 小约 0.70kb, 呈现出 mtDNA 分子大小多态现象。

关键词 团头鲂, 线粒体 DNA, 限制性片段长度多态性, 遗传结构, 多态性, 淤泥湖

在鱼类群体遗传学研究中, 有形态学、同工酶、细胞遗传学与分子遗传学等方法。八十年代中期以 DNA 为基础的分子生物学技术开始应用于鱼类群体遗传分析, 跨入九十年代后分子生物学在群体遗传及相关领域逐步处于统治地位。在众多的分子生物学技术中, 有 DNA 指纹, 随机扩增多态性 DNA (RAPD), rDNA、线粒体细胞色素 b 基因及 D 环序列分析和线粒体 DNA 限制性片段长度多态性 (mtDNA RFLP) 等 [Park 和 Moran, 1994; Ward 和 Grewe, 1994]。迄今为止, 以 mtDNA RFLP 运用最多, 相对比较成熟。目前该技术已在鱼类群体遗传、杂交渐渗、种群鉴定和系统进化等领域取得了很大成功 [Moritz 等, 1987; Bentzen 等, 1988; Billington 和 Hebert, 1988; Grewe 和 Hebert, 1988; Wrigin 等, 1993; Park 和 Moran, 1994; Ward 和 Grewe, 1994; Waldman 和 Wrigin, 1994; Wrigin 和 Waldman, 1994]。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 是我国主要养殖品种, 以肉质鲜美著称。由于其天然资源日益遭受破坏及养殖性能下降等原因而引起人们关注。为此我国在“七五”、“八五”期间相继展开了湖北淤泥湖团头鲂人工与天然生态库研究。并取得了形态学、同工酶方面的资料 [李思发等, 1991; 余来宁等, 1991]。本研究试图从分子水平了解淤泥湖团头鲂的遗传结构特点。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验用的团头鲂均来源于湖北淤泥湖。一部分直接取自该湖。另一部分取自本所淡水鱼类种质资源人工生态库, 该库内团头鲂是“七五”期间从淤泥湖引进的。

mtDNA 提取组织来自活体团头鲂的卵巢。

收稿日期: 1995-11-06。

1.2 方法

mtDNA 提取、酶切和电泳等均按本室建立的方法进行[张四明等,1992]。

2 结果

2.1 淤泥湖团头鲂 mtDNA 单酶酶切分析

用 BamHI、BglI、BglII、ClaI、DraI、EcoRI、HindIII、KpnI、PstI、PvuII、SacI、ScaI、XbaI 和 XhoI 十四种限制性内切酶对纯化后的团头鲂 mtDNA 进行酶切,电泳分离酶切片段。单酶酶切结果显示,在十四种限制性内切酶中,DraI、PvuII、ScaI 和 XbaI 四种限制性内切酶在团头鲂 mtDNA 上呈现出切点多态现象,不同个体所得 mtDNA 片段大小与数目不同。整个团头鲂 mtDNA 分子大小约为 16.21kb。表 1 所示酶切片段大小及数目。图 1 为主要类型(母系集团)的单酶酶切照片。

表 1 淤泥湖团头鲂 mtDNA 限制性内切酶酶切片段大小
Table 1 Fragment size patterns of mtDNA of blunt snout bream after digestion with 14 restriction enzymes, all sizes calculated in kb

BamHI (a)	Bgl I (b)	BglII (c)		ClaI (d)	DraI (e)		EcoRI (f)	HindIII (g)				
A	A	A		A	A	B	A	A				
12.50	8.95	13.00		16.40	6.80	NC	6.85	5.10				
3.60	3.60	3.21			4.68		4.68	5.05				
	3.40				3.20		3.83	4.20				
					1.00		0.65	1.33				
					0.65			0.65				
合计	16.10	15.95	16.21	16.40	16.33		16.01	16.23				
KpnI (h)	PstI (i)	PvuII (j)			SacI (k)	ScaI (l)			XbaI (m)		XhoI (n)	
A	A	A	B	C	A	A	B	C	A	B	A	
16.10	NC	NC	14.10	16.22	16.40	5.61	16.40	NC	8.23	NC	NC	
			1.60			3.90			7.66			
			0.80			2.38						
						1.81						
						1.01						
						0.82						
						0.65						
合计	16.10		16.50	16.22	16.40	16.18	16.40		15.89			

注:未切开的片段没标出;NC:表示无切点或没切开。

2.2 团头鲂 mtDNA RFLP 多态性

2.2.1 团头鲂 mtDNA 限制性位点多态性

由表 1 可知, DraI、PvuII、ScaI 和 XbaI 四种限制性内切酶在 mtDNA 上切点出现多态现象,即产生不同大小与数目的 DNA 片段。按照 mtDNA RFLP 多态特征,本研究共发现 6 种母系集团。以母系集团 1 最为常见。表 2 示淤泥湖团头鲂 mtDNA 不同母系集团特征。

3 讨论

淤泥湖团头鲂 mtDNA 分子大小与其它已报道鱼类的 mtDNA 分子大小相似。本文显示有 6 种形式母系集团存在,但并不意味只存在这 6 种形式母系集团。如采用更多限制性内切酶和更多样本,可能会发现更多的母系集团。由于本研究的样本无法全部直接取材于淤泥湖,因此,各个母系集团的出现频率无法得出。鉴于 mtDNA 母性遗传特点,间接取材可以找出母系集团类型及特点。

笔者观察到二种类型的 mtDNA 多态性,个体间 mtDNA 限制性片段长度多态性与个体间 mtDNA 分子大小多态性。限制性片段长度多态性是由于限制性位点丢失或获得造成的,也就是碱基对发生替换或称点突变。这种情形在鱼类特别是淡水鱼类中相当普遍,它是造成鱼类 mtDNA 多态性的主要原因,也是研究种与种群遗传结构及遗传标记基础。mtDNA 分子大小多态性,虽然近几年也有报道,但比较少见,仅在美洲西鲱 (*Alosa sapidissima*), 条纹鲈 (*Morone saxatilis*) 等少数种发现过 [Wrigin 等, 1993]。有人认为,引起个体间与个体内 mtDNA 分子大小多态性原因可能是 mtDNA D 环区部分缺失或添加所致 [Bentzen 等, 1988; Wrigin 等, 1993]。

同一个体有存在不同 mtDNA 限制性片段长度与 mtDNA 分子大小的多态性现象,称为异质性 (heteroplasmy)。Waldman 和 Wrigin [1994] 报道在美洲西鲱、似石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)、高首鲟 (*Acipenser transmontanus*) 和弓鳍鱼 (*Amia calva*) 有 mtDNA 异质性现象。由于方法限制,本研究无法监测到个体内 mtDNA 限制性片段长度与 mtDNA 大小多态性现象。

申侯德等 [1993] 报道过团头鲂 mtDNA 六种内切酶酶切结果,其材料鱼来源于武汉郊区渔场。由于其工作重点在于构建物理图谱及基因定位,没有进行多态性研究。在申侯德等的研究中有 5 种内切酶与本研究使用的内切酶相同,即 BamH I、Hind III、Bgl I、Bgl II 和 EcoR I。其中 BamH I、Hind III、Bgl I 和 Bgl II 的单酶切结果与本研究结果基本相同,酶切片数数目相同,分子大小相似。但 EcoRI 的酶切结果则不同,本研究为 4 条带,申侯德等的结果为 3 带。

国外对鱼类 mtDNA RFLP 的研究相当深入,特别是对鲑鳟鱼类研究。鲤科鱼类 mtDNA 研究,仅限于我国。从已报道的结果看,基本局限于物理图谱构建,尚无运用 mtDNA 多态性研究种群遗传结构的报道。本研究初步说明 mtDNA 分析对鲤科鱼类同样有效,但方法需进一步改进,如引进同位素标记与 DNA 探针技术。深入广泛地开始我国主养鱼类 mtDNA RFLP 研究,弄清我国主养鱼类的不同地理群体或品系的遗传结构特征,将为其资源的开发与保护提供科学的依据。

参 考 文 献

- [1] 申侯德等, 1993. 武昌鱼肝线粒体 DNA 限制性内切酶酶解图谱与 12Sr RNA 基因初步定位, 水生生物学报, 17(2): 174 ~ 180。
- [2] 余来宁等, 1991. 主要淡水养殖鱼类种质研究, 197 ~ 203. 科学出版社(京)。
- [3] 李思发等, 1991. 团头鲂种群间的形态差异和生化遗传差异, 水产学报, 15(3): 204 ~ 211。
- [4] 张四明等, 1992. 方正银鲫、白鲫与鲫线粒体 DNA 限制性内切酶酶切比较, 水产学报, 16(2): 120 ~ 129。
- [5] Bentzen, P. et al., 1988. Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics*, 118: 509 ~ 518.
- [6] Billington, N. and P. D. N. Hebert, 1988. Mitochondrial DNA variation in great lake walleye (*Stizostedion vitreum*) population.

- Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:643 ~ 654.
- [7] Grewe, P. M and P. D. N. Hebert, 1988. Mitochondrial DNA diversity among broodstocks of the lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:2114 ~ 2122.
- [8] Moritz, C. *et al.*, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* 18:289 ~ 292.
- [9] Park, L. K. and P. Moran, 1994. Development in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* (4):272 ~ 299.
- [10] Waldman, J. R. and I. Wrigin, 1994. Use of DNA analysis in the management of natural fish populations in: *Molecular Environmental Biology* (Gease, S. J. Ed), Lewis Publishers, CRC Press. pp:29 ~ 64.
- [11] Ward, R. D. and P. M. Grewe, 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4:300 ~ 325.
- [12] Wrigin, I. *et al.*, 1998. Use of mitochondrial DNA polymorphisms to estimate the relative contributions of Hudson river and Chesapeake bay striped bass stocks to the mixed fishery on the Atlantic coast. *Trans. Am. Fish. Soc.* 122:669 ~ 684.
- [13] Wrigin, I. and J. R. Waldman, 1994. What DNA can do for you? *Fisheries*, 19(7):16 ~ 27.

MTDNA RFLP ANALYSIS OF BLUNT SNOUT BREAM (*MEGALOBAMA AMBLYCEPHALA*) FROM YUNI LAKE POPULATION

Zhang Siming and Long Hua

(Yangtze River Institute of Fisheries, Jinshashi 434000)

ABSTRACT Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) is a most important cultured species in China. Due to decrease in resource and poor performance in culture, Yuni Lake as an ecological pool was set up to conserve the resources. In this study the investigation on population structure of the species in Yuni Lake was carried out by means of mtDNA RFLP. Fourteen restriction endonucleases viz: BamHI, BglI, BglII, ClaI, DraI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, PvuII, SacI, ScaI, XbaI and XhoI were used. Four restriction endonucleases naming DraI, PvuII, ScaI and XbaI revealed restriction fragment length polymorphisms. Six clones of mtDNA were detected in this study. Besides, one of this fish possessed mtDNA molecular which is 0.70kb smaller than that of the major type of mtDNA was found.

KEYWORDS *Megalobrama amblycephala*, mtDNA, RFLP, Genetic structure, Polymorphism, Yuni Lake