

洱海四种鲤鱼线粒体 DNA 遗传相似性的初步研究

郑冰蓉^{1,2}, 张亚平², 咎瑞光¹

(1. 云南大学生命科学与化学学院生物技术系, 昆明 650091;

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

摘要:用 6 种限制性内切酶对洱海的四种鲤鱼——洱海鲤(*C. barbatus*)、春鲤(*C. longipectoralis*)、大眼鲤(*C. megalophthalmus*)和杞麓鲤(*C. carpio chila*), 其中前三种为洱海特有, 进行了线粒体 DNA(mtDNA)的限制性片段长度多态(RFLP)分析, 构建了它们的 mtDNA 限制性内切酶图谱。结果表明, 这四种鲤鱼在种内和种间均缺乏 mtDNA RFLP。这种现象在鱼类种间的 mtDNA 的 RFLP 研究中是罕见的。分析这一现象的原因, 可能在于这些物种是同域形成物种, 并且其分化时间还相当短。

关键词:鲤属; mtDNA; RFLP; 同域分化; 云南洱海

中图分类号: Q959.46[†]8

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)06-0544-03

A Primary Detection of Close Genetic Similarity of 4 Cyprinus Species in Erhai Lake

ZHENG Bing-rong^{1,2}, ZHANG Ya-ping¹, ZAN Rui-guang²

(1. Department of Biology, School of Life Sciences and Chemistry, Yunnan University,

Kunming, Yunnan, 650091, China; 2. Laboratory of Cellular and Molecular Evolution,

Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan, 650223, China)

Abstract: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) showed that there is no genetic divergence both intra- and interspecific of 4 species of *Cyprinus* (*C. barbatus*, *C. longipectoralis*, *C. megalophthalmus* and *C. carpio chila*) in Erhai lake, Yunnan. Lack of interspecific mtDNA RFLP, namely the close genetic similarity of these four fish species, is possibly resulted from the sympatric speciation and their short divergence time. In addition, the restriction map was made by double digestion.

Key words: *Cyprinus*; mtDNA; RFLP; sympatric speciation; Erhai Lake

动物的线粒体 DNA(mtDNA)是共价闭合的环状双链分子,这一构型简单而稳定。但 mtDNA 一级结构的变异却快速而活跃,导致了种内及种间的广泛多态^[1]。由于这些特点,mtDNA 已成为群体遗传、系统发育、物种起源、基因流动等研究领域的有效遗传标记,并得到了日益普遍的应用。尤其是 mtDNA 的限制性片段长度多态(mtDNA RFLP)分析,因其具有经济、快速、简便、比较可靠等优点而被

广泛用于动物近缘种间及种内群体间的亲缘关系研究,并已积累了不少有价值的资料,其中也包括鱼类^[2-7]。

云南鱼类物种资源丰富,仅鲤属就有 12 种和亚种,其中不少是当地的特有种。有些还是几个不同的种生活在同一水体中,即同域种,云南洱海的土著鲤鱼就属这种情况。洱海共有鲤属鱼类 5 种,其中除杞麓鲤(*C. carpiochila*)在云南其他各主要湖泊

收稿日期:2000-12-11; 修回日期:2001-04-10

基金项目:中科院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室资助项目

作者简介:郑冰蓉(1969-),女,广东人,博士研究生,专业方向:细胞与分子生物学。Tel:0871-5034636。E-mail:brzheng@km159.net

有分布外,其余的洱海鲤(*C. barbatus*),春鲤(*C. longipectoralis*),大眼鲤(*C. megalophthalmus*)和大理鲤(*C. dalisis*)均为洱海特有^[8,9]。对同域分布鱼类近缘种和(或)种下群体的 mtDNA 多态研究,目前还鲜见报道。

本研究采用 mtDNA 的 RFLP 分析法,对洱海的 4 个近缘种鲤鱼,即杞麓鲤、洱海鲤、大眼鲤和春鲤,进行种间 mtDNA 比较研究,目的是考察这些鱼类 mtDNA 的进化情况,为了解这些鱼类的形成和分化提供信息。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼的来源

4 种鲤鱼共 28 尾个体均取自洱海,其中杞麓鲤 10 尾,春鲤 9 尾,洱海鲤 8 尾,大眼鲤 1 尾。

1.2 试剂

6 种限制性内切酶 *Bam*HI、*Bgl*I、*Eco*RI、*Hinc*II、*Hind*III 和 *Pst*I 及其他试剂均购自华美生物工程公司。

1.3 mtDNA 的提取及纯化

参照王文等^[10]的碱变性法从鱼卵、肝脏或肌肉中提取 mtDNA 并纯化。

1.4 mtDNA 酶解及电泳

mtDNA 按厂家提供的酶解条件分别进行酶解,之后用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.1 μg/ml 的溴化乙锭)电泳分离。

1.5 限制性片段长度(kb)测定

用 λDNA/*Hind*III 作为分子量标准,以各片段分子量的对数与其迁移距离绘制标准曲线,依之计算各酶解片段的长度(表 1,表 2)。

表 1 mtDNA 限制性片段数目及长度

Table 1 The length of mtDNA and restriction fragments sizes

内切酶	限制性片段长度				mtDNA 分子大小
Endonuclease	Restriction Fragment Size				Length of mtDNA
<i>Bam</i> HI	8.5	4.4	3.8		16.7
<i>Bgl</i> I	7.2	4.2	3.1	2.1	16.6
<i>Eco</i> RI	12.0	3.5	1.2		16.7
<i>Hinc</i> II	7.4	4.8	4.3		16.5
<i>Hind</i> III	12.6	2.3	1.1	0.7	16.7
<i>Pst</i> I	16.6				16.6

1.6 限制性内切酶谱的建立

利用单酶解(图 1)、双酶解结合单酶部分酶解

的方法建立 *Bam*III、*Bgl*I、*Eco*RI、*Hinc*II 和 *Pst*I 的限制性内切酶谱(图 2)。*Hind*III 因切点数较多,酶谱难以确定。

表 2 mtDNA 双酶解片段数目及长度

Table 2 Restriction fragments sizes of mtDNA by double-digestion

内切酶	酶解片段数目及长度					
Endonuclease	Restriction Fragment Size(kb)					
<i>Bam</i> HI+ <i>Eco</i> RI	6.0	4.4	2.5	1.5	1.2	1.1
<i>Bam</i> HI+ <i>Hinc</i> II	7.2	3.6	3.1	1.3	1.1	(-)
<i>Bam</i> HI+ <i>Hind</i> III	6.6	3.9	2.3	1.7	1.1	0.7 (-)
<i>Bam</i> HI+ <i>Pst</i> I	8.5	4.4	3.0	0.7		
<i>Eco</i> RI+ <i>Bgl</i> I	4.0	3.0	3.0	3.0	2.1	1.1 (-)
<i>Eco</i> RI+ <i>Pst</i> I	11.2	3.5	1.2	0.8		
<i>Hinc</i> II+ <i>Bgl</i> I	5.4	3.2	2.2	2.1	1.8	1.1 1.0

注:“(—)”表示未检测到的小片段。这些小片段的在及数目是根据两个单酶的切点数推算而来。

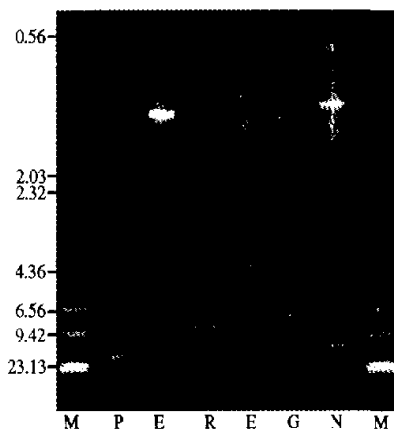


图 1 4 种鲤鱼的 mtDNA 单酶解电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of mtDNAs digested with restriction endonucleases for the 4 species of Cyprinus

M: Marker, λDNA/*Hind*III; P: *Pst*I; E: *Eco*RI;
B: *Bam*HI; H: *Hinc*II; G: *Bgl*I; N: *Hind*III

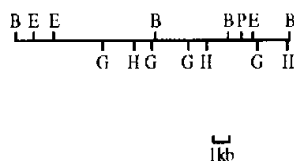


图 2 4 种鲤鱼 mtDNA 的限制性内切酶谱

Fig. 2 Restriction map of 4 species of Cyprinus

2 结果与讨论

4种鲤鱼 mtDNA 分子大小均约为 16.6kb,未发现 mtDNA 分子的长度多态。用 6 种限制性内切酶 *Bam*HI、*Bgl*I、*Eco*RI、*Hinc*II、*Hind*III 和 *Pst*I 进行 mtDNA RFLP 分析,4 个种共 28 个体,无论种内或种间均未检测出限制性片段长度的多态性。

洱海的这四种鲤鱼,除杞麓鲤外,余下的春鲤、洱海鲤和大眼鲤都是单种群物种。而这次研究所采集的杞麓鲤个体也都来自同一种群,即黄壳鲤种群。因此,“种内缺乏多态”这一点与他人在哺乳类和其它鱼类上证明过的种群内 mtDNA 差异程度低^[11~14]的结果是一致的。

种间也未揭示出 mtDNA 的 RFLP,这还未曾有过报道。分析其原因,一方面可能在于我们所研究的这四种鲤鱼分化和形成的时间还不很长。据高礼存等的研究,洱海鱼类发生强烈分化的时代是在洱海发展演变的深水期,即中更新世中期到晚更新世早期这一地质阶段^[15],距今仅 12.8 万年,最多不超过 45 万年。如果根据 Brown 等在哺乳类上确定^[16],而又为人们在研究其他各类动物时广泛引用的 mtDNA 平均每百万年发生 2% 的碱基替代这一进化速率来估算,则这四种鲤鱼理论上可能存在的差异为 0.0026~0.0090。这与已作过的种间差异(不完全统计;0.0213~0.7100)比较,确实小得多。另一方面则很可能是与洱海几种土著鲤鱼特殊的物种形成和物种分布方式有关。洱海的几种鲤鱼是同域分化和同域分布的近缘物种,这已是我国鱼类学界的共识^[8,9,17]。相对于异域物种形成,鱼类同域物种强烈分化形成的例子很少(前人的工作亦几乎是研究异域形成物种),可能仅限于少数几个湖泊(如前苏联的贝加尔湖,非洲的维多利亚湖、尼亚萨湖、坦噶尼亚湖,南美的的喀喀湖等)。而这两类物种形成方式是截然相反的两种过程——“异域物种形成必须包括群体的地理隔离及其在适应环境时遗传上的逐渐趋异,生殖隔离是作为这种遗传趋异的偶然副产物而出现的。同域物种形成则是异域物种形成的逆过程,其物种形成的第一步即是完成生殖隔离,接着才是渐进的适应性遗传趋异。”而且,“引起生殖隔离的遗传差异开始都是很少的,生殖隔离只是受少数作用大的基因控制”^[18]。很清楚,作为同域物种形成的几种洱海鲤鱼,它们彼此发生分化的第一

步也可能是形成生殖隔离。至于生殖隔离的起因,应该也是控制生殖隔离的那些基因的直接突变^[19]。

参考文献(References):

- [1] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA[M]. In Nei M and Roehn R K. (eds), "Evolution of gene and proteins", Sunderland;1983, p62~88.
- [2] Berningham E, Avise J C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the Southeastern United States[J]. Genetics. 1986, 113:939~965.
- [3] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA variation in Great Lakes walleye (*Stizostedion vitreum*) population[J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1988, 45: 643~654.
- [4] Harrison R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology[J]. Trends Ecol. Evol. 1989, 4:6~11.
- [5] 张亚平, 施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况[J]. 动物学研究. 1992, 13(3):289~298.
- [6] 戴建华, 殷文莉, 宋平, 等. 鲤鱼的线粒体 DNA 的研究[J]. 遗传, 1994, 16(5):6~9.
- [7] 谢志峰, 杨代淑, 熊全沫, 等. 太湖新银鱼线粒体 DNA 物理图谱及分析[J]. 遗传, 1998, 20(1):16~19.
- [8] 陈湘彝, 黄宏金. VIII 鲤亚科[M]. 见伍献文等. 中国鲤科鱼类志(下卷), 上海人民出版社. 1977, 395~438.
- [9] 褚新洛, 等. 鲤亚科[M]. 云南鱼类志(上), 北京: 科学出版社. 1989, 322~354.
- [10] 王文, 施立明. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法[J]. 动物学研究. 1993, 14(2):197~198.
- [11] Avise J C, Lansman R A. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of high animals[M]. In Nei M and Roehn R K. (eds), "Evolution of gene and proteins", Sunderland; 1983, p147~164.
- [12] Hanzawa N, et al. Variability of mitochondrial DNA in Japanese dace, *Tribolodon hakonensis* (Cyprinidae)[J]. Jpn. J. Genet. 1987, 62:27~38.
- [13] Birt T P J M Green, Davidson W S. Analysis of Mitochondrial DNA in allpatric anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. Can. J. Zool. 1986, 64:118~120.
- [14] Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P, Wilson A C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid Fishes suggested by mitochondrial DNA Sequences[J]. Nature. Lond. 1990, 347: 550~553.
- [15] 高礼存, 庄大栋. 云南洱海的形成、演变与鱼类区系的演替及其分化[C]. 云南洱海科学论文集, 1989, 277~283.
- [16] Brown W M, et al. Rapid evolution of animal Mitochondrial DNA[J]. PNAS USA. 1979, 76:1967~1971.
- [17] 李树深. 云南湖泊鱼类的区系及其类型分化[J]. 动物学报. 1982, 28(2): 169~176.
- [18] David J M. The origin of species[M]. In "Ecological genetics". The University Of Minnesota Press, USA. 1981, p40~422.
- [19] 赵凯, 李军祥, 张亚平, 等. 青海湖裸鲤 mtDNA 遗传多样性的初步研究[J]. 遗传, 2001, 23(5): 445~448.