

青海湖裸鲤的种群结构和线粒体 DNA 变异

赵 凯¹, 何舜平², 彭作刚², 李俊兵²

(1. 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810003; 2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:对青海湖裸鲤 55 个个体 Cyt *b* 基因全序列进行了测定和分析, 探讨了种群结构和群体遗传多样性。用 MEGA2.1 软件分析了碱基组成和序列变异; 以黄河花斑裸鲤为外群, 构建了单倍型的 NJ 树; 用 Arlequin Ver. 2 000 程序计算了群体内遗传变异值(F_{st})。结果显示, 青海湖裸鲤群体没有显著的种群结构, 提示青海湖裸鲤群体内存在广泛的基因交流; 种群的遗传多样性较低($\pi = 0.7828 \pm 0.0532$), 青海湖裸鲤种群很可能在历史上遭受过严重的“瓶颈效应”。

关键词:青海湖裸鲤; 线粒体 DNA; 种群结构; 遗传变异

中图分类号: S931.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-8996(2006)04-0001-04

Mitochondrial diversity and population structure of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* (Teleostei: Cyprinidae)

ZHAO Kai¹, HE Shun-ping², PENG Zuo-gang², LI Jun-bing²

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

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: We examined the genetic diversity and population structure of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* by sequencing mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome b (Cyt b) genes (1140 bp) from 55 individuals. Nucleotide composition was calculated using MEGA 2.1. Selecting *Gymnocypris eckloni* as outgroups, one molecular phylogenetic tree of 17 haplotypes was constructed using NJ in MEGA 2.1. The genetic variability (F_{st}) in population of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* was calculated with Arlequin Ver.2000. Our results showed that there was no significant genetic structuring in population of *Gymnocypris przewalskii przewalskii*, which suggested that there existed strong gene flow. The population of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* exhibited a low nucleotide diversity ($\pi = 0.7828 \pm 0.0532$), which suggested this population could have experienced severe bottleneck effect in history.

Key words: *Gymnocypris przewalskii przewalskii*; mtDNA; population structure; genetic diversity

青海湖位于青藏高原东北部, 是高原最大的内陆咸水湖泊。裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)在青海湖水系仅分布着裸鲤属(*Gymnocypris*)的一个特有种——青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[1]。青海湖裸鲤由于具有适合于咸淡水环境和高原鱼类少有的洄游繁殖生态特性, 又是已知青藏高原发挥经济效益最大的鱼类, 因而长期以来受到鱼类学家的关注。

对青海湖裸鲤的研究最早始于 1876 年, 在其后的一个多世纪里, 许多学者根据形态学特征先后将青海湖地区裸鲤共描述了 7 个种, 直到 1975 年朱松泉等认为这 7 个种属于同物异名, 并将其归并为青海湖裸鲤一种^[1]。由此也反映出青海湖裸鲤种群表型特征存在较大的变异性, 因而通过不同的标记技术, 对青海湖裸鲤种群结构和遗传变异开展深入调查就显得非常有意义。随着生化和分子生物学技术的发展, 近些年对青海湖裸鲤种群结构和遗传变异特征的研究已有一些报道, 但由于青海湖地区地处高海

收稿日期: 2005-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(32005008)资助。

作者简介: 赵 凯(1968—), 男, 青海湟源人, 副教授, 博士。研究方向: 鱼类系统发育与生物地理学。

拔,环境恶劣,新鲜样品采集很困难,加之物种濒危,已有的相关研究仅限于局部采样和小样本分析^[2-4],研究结果也主要停留在多态态型的表述和遗传多样性的定性描述上,尚不能提供一个详细而明确的青海湖裸鲤种群结构和遗传多样性的科学推断。线粒体 DNA(mtDNA)对于检测种群结构和评估种群遗传变异显示出更强的敏感性^[5]。本研究立足群体水平,通过对青海湖裸鲤群体的广泛采样,检测线粒体 DNA 细胞色素 *b*(Cyt *b*)基因全序列,分析青海湖裸鲤的种群结构和遗传变异水平,为青藏高原鱼类的分子系统学研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品来源

样品为 1999—2003 年野外采集的青海湖裸鲤 55 个个体,分别来自于青海湖周边 5 条内流河的青海湖裸鲤繁殖群体,以及湖区的北、东和南 3 个采样点(表 1)。样品用 95%酒精固定,存放在中国科学院武汉水生生物研究所。

1.2 PCR 扩增和序列测定

采用 Ausubel^[6]的方法从肌肉中提取总 DNA。总的 60 μ L PCR 反应体系包括 100 ng 模板,0.75 μ L dNTP,1.5 μ L 引物,5.0 μ L 10 \times Buffer,3U Taq 酶。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 180s,然后重复 30 个循环,包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30s,63 $^{\circ}$ C 复性 60s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 420s。扩增产物用 Glassmilk 试剂盒回收纯化目的片断,由联合基因公司测序。使用引物为 L14724(5' - GAC TTG AAA AAC CAC CGT TC - 3')和 H15915(5' - CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC - 3')。

1.3 数据处理

序列的排定采用 CLUSTAL W^[7]程序并辅以手工校正。核苷酸的组成和可变位点等遗传变异分析采用 MEGA2.1^[8]软件。用 MEGA2.1 中的 Kimura 2 - parameter 模式构建所有单倍型的 NJ 树^[8]。

种群结构和遗传变异分析采用 Arlequin Ver.2 000^[9]程序,将青海湖裸鲤种群按样品来源划分为不同的组群,估计不同组群间遗传变异(F_{st})的分布,进而估计种群遗传结构。核苷酸多样性(π)和单倍型多样性(h)被用来评估种群的遗传多样性^[10]。

2 结果与分析

2.1 序列变异

对来自青海湖裸鲤的 55 个个体进行排序分析后,得到全序列长 1 140 bp,其中保守位点 1 122 个,变异位点 18 个,包括 7 个简约信息位点和 11 个单个变异位点。大多数的变异发生在密码子第 3 位(94.44%),第 1 位仅为 5.55%,第 2 位未检测到变异。Cyt *b* 基因片段中 A、T、C、G 碱基平均含量分别为 26.7%、31.2%、26%、16.1%,表现出明显的反 G 偏倚,显示细胞色素 *b* 基因的共同特性^[11]。其中 A + T 含量(57.9%)明显高于 G + C(42.1%)含量。在细胞色素 *b* 全序列中,群体内有 17 个位点发生转换,仅 1 个位点发生了颠换。一般认为^[11,12],序列变异位点的转换易在鱼类的近亲种间较频繁地发生,而颠换在较远缘种间逐渐明显,在同种的鱼类间,转换往往在数量上远超过颠换。

2.2 单倍型的 NJ 分析

在全部 55 个个体中共检测出 17 个单倍型(表 1)。单倍型在群体中的分布显示,来自于每一取样群体的样品没有形成自己特有的单倍型类群,一些单倍型(Hap 2、Hap 4、Hap 7、Hap 8、Hap 15 和 Hap 16)被来自不同取样群体的个体共享。其中最大的单倍型组(Hap 8)包含 23 个个体,而且广泛分布在每一取样群体。

表 1 青海湖裸鲤不同取样群体中 Cyt b 单倍型(Hap 1~17)的分布

样地	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	n ^b	单倍型	特有单倍型
沙柳河		1	2	1			1	4	1							2	1	13	8	3
泉吉河								2		1					1	2		6	4	1
布哈河			1	1				3	1									6	4	0
黑马河			1	1				2	1							1		6	5	0
小北河	1							4							1			6	3	2
青海湖湖北					1		1	2				1				1		6	5	2
青海湖湖东			1				1	3				1						6	4	1
青海湖湖南						1		3						1	1			6	4	2
n ^a	1	1	5	3	1	1	3	23	2	1	1	1	1	1	3	6	1	55		

注:n^a表示每个单倍型包含的个体总数;n^b表示每一采样点的样品数。

以黄河花斑裸鲤作为外类群,采用 NJ 法构建了 17 个单倍型的关系树(图 1)。图中 Hap 1~17 分别代表单倍型 1~17,节点的数字为 NJ 分析的 Bootstrap 支持率(1 000 次重复)。拓朴结构显示,来自青海湖裸鲤的 17 个单倍型没有分化成不同的谱系,各枝的节点支持率均低于 50%,而且青海湖裸鲤 8 个取样群体的单倍型在 NJ 树上相互交叉,即使各群体的一些特有单倍型在 NJ 树上也没有形成独有的进化枝。这些结果提示青海湖裸鲤各取样群体在 Cyt b 水平没有显著的群体结构。

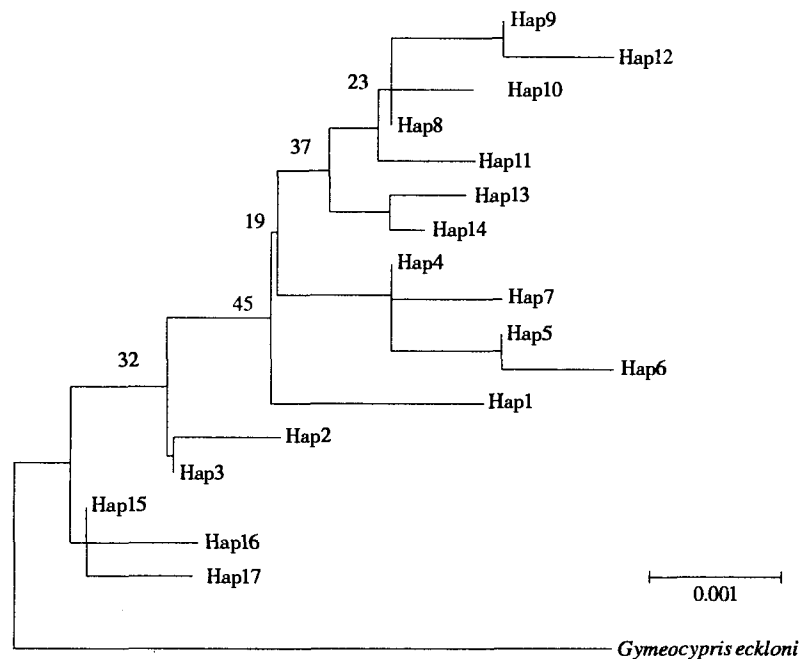


图 1 青海湖裸鲤 17 个单倍型的 NJ 树

2.3 种群结构和群体遗传变异

为了进一步调查青海湖裸鲤的种群结构,我们根据样品来源的不同群体划分不同的组群,进行组群间的遗传变异分析,用 10 000 次重复随机抽样单倍型重排后进行显著性检验。结果各群体间的遗传变异值(F_{st})的统计学检验差异均不显著($P > 0.05$)(表 2),表明青海湖裸鲤种群内无显著的地理结构或种群结构。计算青海湖裸鲤群体单倍型多样性(h)和核苷酸变异度(π)分别为 0.7828 ± 0.0532 和 0.00205 ± 0.00126 。

表 2 不同样地青海湖裸鲤群体内遗传变异值 (F_{st})

	沙柳河	泉吉河	布哈河	黑马河	小北河	青海湖湖北	青海湖湖东	青海湖湖南
沙柳河		-0.09091	-0.13750	-0.00364	-0.04492	-0.04492	-0.07692	
泉吉河	0.92793		-0.07442	0.08235	0.00847	-0.15862	-0.10526	-0.04348
布哈河	0.99099	0.90991		-0.00755	-0.02534	-0.08649	-0.10455	-0.07027
黑马河	0.24324	0.20721	0.61261		-0.04198	0.09333	-0.06957	-0.10000
小北河	0.55856	0.29730	0.48649	0.57658		0.00660	-0.09709	0.00426
青海湖湖北	0.75676	0.99099	0.80180	0.26126	0.39640		-0.12500	0.00847
青海湖湖东	0.99099	0.80180	0.99099	0.67568	0.91892	0.99099		-0.08387
青海湖湖南	0.72973	0.99099	0.99099	0.25225	0.35135	0.99099	0.69369	-0.07692

注: 对角线以上为青海湖裸鲤种群遗传变异值 (F_{st}); 对角线以下为 10 000 次重复随机抽样单倍型重排后显著性检验的 P 值。

3 讨论

在实验取得的 *Cyt b* 资料中, 用单倍型构建的进化树和差异不显著的种群遗传变异值 (F_{st}) 均表明青海湖裸鲤种群在 *Cyt b* 水平无显著的地理结构或种群结构, 提示青海湖裸鲤种群内存在广泛的基因交流, 同时本试验的结果也有力地支持了形态学上对青海湖裸鲤种的归并。一般认为, 由于地理隔离造成鱼类基因交流的完全中断, 或同一水域中不同栖息环境的存在部分地限制鱼类的交流, 是物种形成种群结构甚至分化出亚种的重要因素^[13]。有研究表明^[14], 黄河花斑裸鲤存在明显种群结构, 其主要原因是黄河上游几大峡谷在一定程度上阻碍了花斑裸鲤群体内的基因交流。与此形成鲜明对比的是青海湖周边虽有众多内流河, 最长的布哈河延伸长 400 余公里, 但这些河流仅作为每年繁殖季节裸鲤鱼洄游产卵的场所, 加之青海湖大致相同的湖泊底栖环境和极其贫养的特点^[15], 鱼类需长途迁行觅食, 从而促使了群体内广泛的基因交流。由此可见, 青海湖虽然是青藏高原最大的咸水湖泊, 但青海湖裸鲤种群在其进化过程中并未形成显著的遗传结构。

在 55 个青海湖裸鲤的个体中只检测到 17 种单倍型, *Cyt b* 单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 与一般鲤科鱼类相比也保持较低的水平, 属具较小种内变异的种群^[5, 16, 17]。种群的 mtDNA 多态性相对贫乏, 通常的解释为种群曾经历过“瓶颈效应”的打击, 而后又受“创立者效应”作用的结果^[18]。青藏高原自第四纪以来经历了数次地质和气候的改变^[19], 生活在高原水域中的鱼类或多或少经历过瓶颈, 由于适应的选择可能导致了遗传多样性普遍的贫乏。自然群体中的遗传变异是该群体将来进化的原材料, 遗传变异的丧失, 对于生活于波动环境中的野生群体是一个极大的威胁。因此, 目前对青海湖裸鲤种群的保护措施应继续进行下去, 尤其要加强有利于恢复和增加群体遗传变异的措施。

致谢 本文样品采样得到青海大学陈刚教授和青海省水产局史建全、祁洪芳老师的大力协助; 实验得到中科院遗传与发育生物学研究所段子渊博士、中科院水生生物研究所刘焕章副研究员、王绪楨博士、彭作刚博士、郭宪光博士和杨雷硕士的热心帮助; 中科院昆明动物研究所张亚平院士、庞峻峰博士、向余劲功博士和吴桂生博士对资料分析给予了指导, 在此谨致衷心感谢!

参考文献:

- [1] 朱松泉, 武云飞. 青海湖地区鱼类区系的研究 [A]. 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 [C]. 北京: 科学出版社, 1975. 9 - 26.
- [2] 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.
- [3] 祁得林. 青海湖裸鲤和鲤鱼组织乳酸脱氢酶同工酶比较研究 [J]. 青海大学学报 (自然科学版), 2003, 21(6): 1 - 3.
- [4] 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.
- [5] Perdiges A, Cunha C, Coelho M M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei: Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequences [J]. Mol phylogenetic Evol, 2004, 31, 192 - 203.
- [6] Ausubel F M. Short Protocols in Molecular Biology [M]. New York: John Wiley and Sons, 1992.
- [7] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions - specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673 - 4680.

(下转第 9 页)

- [18] Matsuo E. Cultural Practices Influencing Premature Daughter Leaf and/or Shoot Emergence in Scale-propagated Easter Lily[J]. HortScience, 1982, 17:196-198.
- [19] Matsuo E. Scale Bulblet Malformations Seen in Liliium Longiflorum during Scale Propagation[J]. HortScience, 1986, 21(1): 150.
- [20] Novak F J. Tissue Culture Propagation of Liliium Hybrids[J]. Scientia Hort, 1981, 14(2): 191-199.
- [21] Stimart D P, Ascher P D. Tissue Culture of Bulb Scale Sections for Asexual Propagation of Liliium Longiflorum Thunb[J]. Amer Soc Hort Sci, 1981, 103: 182-184.
- [22] Takayama S. Differentiation in Liliium Bulb Scale Grown in Vitro[J]. Physiologia Plantarum, 1979, 46: 184-190.
- [23] Takayama S, Misawa M. Differentiation in Liliium Bulb Scales Grown in Vitro, Effect of Activated Charcol, Physiological Age of Bulbs and Sucrose Concentration on Differentiation and Scale Leaf Formation in Vitro[J]. Physiol Plant, 1980, 48: 121-125.
- [24] Takayama S. Cultivation on in Vitro-Propagated Liliium Bulbs in soil[J]. Amer Soc Hort Sci, 1982, 107(5): 830-834.
- [25] 李 洲. 唐菖蒲叶片、花轴立体培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1982, (4): 33-34.
- [26] 王庆云. 唐菖蒲球茎芽的立体培养[J]. 植物生理学通讯, 1983, (6): 40-41.
- [27] Hussey G. In Vitro Propagation of Gladiolus by Precocious Axillary Shoot Formation[J]. Sci Hort, 1977, (6): 237.
- [28] 杨乃博. 郁金香鳞茎、心叶的不定芽分化[J]. 植物生理学通讯, 1985, (4): 37.
- [29] Wright N A, Alderson P G. The Growth of Tulip Tissue in Vitro[Z]. Acta Horticulturae, 1980, 109: 263-270.
- [30] 顾亨森, 高翠华. 植物激素对水仙鳞茎切块愈伤组织的诱导、保持和器官分化的影响[J]. 园艺学报, 1987, 14(1): 53-56.
- [31] 徐玉冰. 麝香石竹的花器培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1986, (3): 42.
- [32] 刘继红. 大花君子兰叶片培养成苗[J]. 植物生理学通讯, 1987, (5): 46.
- [33] 陈为民. 大花君子兰子房、花托和花丝培养再生植株[J]. 植物生理学通讯, 1986, (3): 46.
- [34] 刘 敏, 舒金生. 君子兰未成熟胚的试管培养[J]. 植物生理学通讯, 1983, (4): 43.
- [35] Appelgren M. Effects of Supplementary Light to Mother Plants on Adventitious Shoot Formation in Flower Peduncle Segments of Begonia \times hiemalis Fotsch in Vitro[J]. Scientia Horticulturae, 1985, 25(1): 77-83.
- [36] 谭文澄, 载策刚. 花叶芋的液体静置培养快速繁殖[J]. 云南植物研究, 1987, 9(3): 348-352.
- [37] 王绶衍. 彩叶芋的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1985, (3): 26-27.

(责任编辑 杨君丽)

(上接第 4 页)

- [8] Kumar S, Tamura K, Jakobsen B I, et al. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software[M]. Tempe: Arizona State University, 2001.
- [9] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN Version 2.000: A software for population genetic data analysis[M]. Switzerland: University of Geneva, 2000.
- [10] Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [11] Cantatore P, Roberti M, Pesole G, et al. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals[J]. J Mol Evol. 1994, 39: 589-597.
- [12] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers [J]. Proc Natl acad sci, USA, 1989, 86: 6196-6200.
- [13] Cassel A, Tammaru T. Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (Coenonympha hero: Lepidoptera, Nymphalidae): implications for conservation[J]. Conservation Genetics, 2003, 4: 83-93.
- [14] 赵 凯, 李俊兵, 杨公社, 等. 青海湖及其相邻水系特有裸鲤属鱼类的分子系统发育[J]. 科学通报, 2005, 50(13): 1348-1355.
- [15] 王基琳, 郑英明, 邢定介. 青海湖裸鲤饵料基础调查报告[A]. 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 [C]. 北京: 科学出版社, 1975. 77-102.
- [16] Alves M J, Coelho H, Collares-pereira M J, et al. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaecypris hispanica*: importance for conservation[J]. Heredity, 2001, 87: 463-473.
- [17] Mesquita N, Carvalho G, Shaw P, et al. River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis [J]. Heredity, 2002, 86: 253-264.
- [18] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48(suppl. 1): 80-94.
- [19] 李吉钧, 方小敏, 潘保田, 等. 新生代晚期青藏高原强烈隆起及其对周边环境的影响[J]. 第四纪研究, 2001, 21(5): 381-391.

(责任编辑 杨君丽)