雌核发育银鲫两个不同品系 线粒体 DNA 比较^{*}

樊连春 赖宇鹏 朱蓝菲 梁绍昌 桂建芳 (中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉 430072)

提要 于 1996年4月在中国科学院水生生物研究所关桥实验场取得银鲫 E 系(8♀,2 δ) 和D 系(9♀,1 δ)的卵巢(♀)或肝脏(δ)组织,分离纯化其线粒体 DNA,以此为材料,用 25 种限制性内切酶分析了银鲫这两个雌核发育系的线粒体 DNA,构建了两系鱼 mt DNA 的 19 种 酶41 个位点的酶切图谱。统计比较酶切片段的大小,发现 5 种内切酶(*Ava* II, *BamH* I, *Bgl* I, *Sph* I, *Xba* I)酶切位点在两个雌核发育系间存在差异。这些多态性,既可以作为区分两 个雌核发育系的遗传标记,同时也为其进化遗传学的研究和银鲫育种提供了丰富的资料。 关键词 雌核发育银鲫 限制性内切酶 mtDNA 遗传标记 学科分类号 Q75

脊椎动物线粒体 DNA(mtDNA) 呈母系遗传特性(Brown, 1983), 利用限制性内切酶处 理mtDNA, 得到的限制性片段长度多态(RFLP) 或限制性内切酶图谱既具有相对的稳定 性, 又能反映一定的变异, 是从分子水平研究动物种群遗传学和进化遗传学的一种有效的 手段(桂建芳, 1989)。银鲫是一种独特的可进行天然雌核发育生殖的两性型种群(蒋一 等, 1983)。近 20 年来的繁育实践和人工调控育种研究表明, 银鲫具有明显的遗传异质性 和多样性(桂建芳, 1997; 朱蓝菲等, 1987, 1993)。本文报告首次对银鲫 E、D 两个雌核发育 系的研究结果, 以期进一步确定银鲫不同雌核发育系的分子遗传学标记, 并为鉴定银鲫复 合种的遗传背景和来源提供有用的辨别参数。

- 1 材料与方法
- 1.1 材料

实验用银鲫(*Carassius auratus gibelio*)为: E 系银鲫($8 \Leftrightarrow , 2 = \delta$), D 系银鲫($9 \Leftrightarrow , 1 = \delta$), 于 1996 年 4 月 取自中国科学院水生生物研究所关桥实验场。

1.2 试剂

所用 25 种限制性内切酶(表 1) 购自德国 Boehringer Mannheim 公司;其它试剂均为国 产分析纯。

1.3 mtDNA 的分离及纯化

* 国家杰出青年科学基金资 助项目, 39425010 号。樊连春, 男, 出生于 1968 年 3 月, 博士, 助理研究员, E- mail: jgui@lily.whihb.ac. cn

收稿日期: 1998-05-04, 收修改稿日期: 1999-05-12

按樊连春等(1994)报道的方法。

1.4 限制性内切酶的酶解

酶切反应条件参照 Sambrook 等(1989) 描述的方法。

1.5 琼脂糖凝胶电泳

酶解后的 DNA 片段用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0. lmg/ml 溴化乙锭)电泳分离。电泳缓 冲液为0.5×TBE,于4−10V/cm 下电泳 3−5h,紫外灯下观察拍照。

1.6 数据分析方法

根据 Nei(1987) 的公式:

$$S = 2m_{xy}/(m_x + m_y)$$
(1)

$$P_{1} = 1 - (S)^{\frac{1}{r}}$$
⁽²⁾

$$P = P_1 \frac{\sum_{i=1}^{k} r_i (m_i - m_{xyi}) / \{ [1 - (1 - P)^{r_i}] [2 - (1 - P_1)^{r_i}] \}}{\sum_{i=1}^{k} r_i (m_i - m_{xyi}) / \{ [1 - (1 - P)^{r_i}] \} }$$
(3)

$$\sum_{i=1}^{n} i r_i m_i / [2 - (1 - P_1)^{r_i}]$$

$$a = \frac{3}{10} \left[1 - \frac{4}{P_1} \right]$$
(4)

$$d = -\frac{1}{4} \ln \left[1 - \frac{1}{3} P \right] \tag{4}$$

$$S = (1 - P)' \tag{5}$$

$$V(d_i) = (2 - S)(1 - S)/2r^2 mS$$
(6)

$$V(d) = \frac{1}{\sum_{i=1}^{k} \left[\frac{1}{V(d_i)} \right]}$$
(7)

$$T = d/2$$

(8)

式中, *P* 为碱基置换度, 代表种群间的遗传距离, *d* 为每一个位点净核苷酸替代的平均数, *S* 为种群间的限制性位点共享度, m_x 和 m_y 分别为种群 x 和 y 的限制性位点数, m_{xy} 为两 种群间相同的位点数, *r* 为限制性内切酶识别序列的碱基数, V(d) 为方差, λ 为碱基替代 率, *T* 为分化年代。

根据限制性位点差异法计算两品系之间的遗传距离(*P*), 然后求得净核苷酸替代的 平均数(*d*), 推算两系银鲫的分化年代(*T*)。

2 结果

2.1 E系和 D系银鲫 mtDNA 酶切产物测定及两系间 mtDNA 酶切差异的发现

E 系与 D 系银鲫 mtDNA 经 25 种内切酶酶切电泳分析后表明,在 E 系和 D 系内的个体间没有差异,这是多年来人工繁育养殖筛选的结果。E 系和 D 系银鲫 mtDNA 经 25 种内切酶酶切所得片段大小见表 1。由表 1 可见,除 Xho I 在两种鱼中均没有切点外,其余 24 种酶分别产生了 1—10 个片段。比较两种鱼 24 种酶切结果发现:绝大多数内切酶酶切结果在 E、D 两系间相同,但在 Ava II、BanH I、Bgl I、Sph I、Xba I 五种酶上显现出差异。其中 Ava II 在两种鱼 mtDNA 上存在一个酶切位点的差异,结果导致其在 E 系、D 系银鲫中的两条大的酶切片段分别为 4.6kb 和 3.4kb 以及 5.1kb 和 2.9kb; BanH I 在 E 系银

鲫中有两个切点,所切的两个片段大小为 13.0kb 和 3.6kb,而在 D 系银鲫中则获得 6. 8kb、6.2kb 和 3.6kb 三个片段; Bgl I 在 E 系银鲫中只有一个切点,因此产生一个片段,而 在 D 系银鲫中则有三个切点,大小分别为 8.6kb、5.2kb、2.8kb; Xba I 和 Sph I 在 D 系银鲫 中均没有切点,而在 E 系银鲫中 Xba I 具有两个切点,产生 11.5kb,5.1kb 两个片段, SphI 有一个切点,形成一个片段。图 1 示几个典型的具有多个酶切位点以及在 E、D 两系间 具有不同酶切位点的酶切电泳图片。图中 M_L = 1kb ladder, M_λ = λ DNA/Hind III+ EcoR I, St= Sty I, H= Hinf I, M= Msp I, Ss= Ssp I, Sm= Sma I, A= Ava II, Sp= Sph I, Xb= XbaI, Bg= Bgl I, Ba= BamH I。

表1 E系、D系银鲫 mtDNA 单酶酶切片段大小

Tab. 1 The sizes of the restriction fragments of mtDNAs from silver

•	E 1	1.D	1	1	· 1		1	
erneign egrn	E clone	and D	clone	hw7	single	enzme	direction	
crucian carp	L CIONC	and D	CIONC	Dy.	Singic	Chizyme	uguation	

限制酶	识别		E 系	D 系			
9410194	_ 碱基数	切点数	片段大小(kb)	切点数	片段大小(kb)		
Apa I	6	3	9. 0, 6. 5, 1. 1	3	9. 0, 6. 5, 1. 1		
$\mathit{Bam}HI^*$	6	2	13. 0, 3. 6	3	6. 8, 6. 2, 3. 6		
Bgl I *	6	1	16. 6	3	8. 6, 5. 2, 2. 8		
Bgl II	6	1	16. 6	1	16. 6		
BstE II	6	2	14. 2, 2. 4	2	14. 2, 2. 4		
BstX I	6	1	16. 6	1	16. 6		
EcoR I	6	4	7. 35, 7. 35, 1. 2, 0. 7	4	7. 35, 7. 35, 1. 2, 0. 7		
EcoR V	6	1	16. 6	1	16. 6		
Hind III	6	5	11. 6, 2. 4, 1. 2, 0. 8, 0. 6	5	11. 6, 2. 4, 1. 2, 0. 8, 0 6		
Kpn I	6	1	16. 6	1	16. 6		
Nco I	6	3	12. 6, 2. 5, 1. 5	3	12. 6, 2. 5, 1. 5		
Nsi I	6	1	16. 6	1	16. 6		
Pst I	6	2	12. 2, 4. 4	2	12 2, 4.4		
Pvu II	6	6	5. 1, 5. 1, 2. 7, 2. 3, 0. 9, 0. 5	6	5, 1, 5, 1, 2, 7, 2, 3, 0, 9, 0, 5		
$Sac \mathrm{I}$	6	1	16. 6	1	16. 6		
$Sal \; \mathrm{I}$	6	1	16. 6	1	16. 6		
SmaI	6	3	14. 5, 1. 2, 0. 9	3	14. 5, 1. 2, 0. 9		
$S\!ph\mathrm{I}\;{}^*$	6	1	16. 6	0			
Xba I *	6	2	11.5, 5.14	0			
Xho I	6	0		0			
$Ava \amalg^*$	5	7	4. 6, 3. 4, 2. 8, 1. 4, 1. 15, 0. 85, 0. 5	7	5. 1, 2 9, 2 8, 1.4, 1. 15, 0 85, 0. 5		
Ssp I**	4	10	3 4, 2.8, 1.5, 1.4, 1.2, 1.1, 0.8, 0.7, 0.65, 0.6	10	3. 4, 2. 8, 1. 5, 1. 4, 1. 2, 1. 1, 0. 8, 0. 7, 0. 65, 0. 6		

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

歩ま

					-24
限制酶	识别		E 系		D 系
	碱基数	切点数	片段大小(kb)	切点数	片段大小(kb)
Sty I ^{**}	4	10	2 15, 2. 0, 1. 3, 1. 25, 1. 2, 0. 95, 0. 8, 0. 7, 0. 6, 0. 4	10	2 15, 2. 0, 1. 3, 1. 25, 1. 2, 0. 95, 0. 8, 0. 7, 0. 6, 0. 4
Hinf I *	* 4	9	2 15, 1. 8, 1. 2, 0 95, 0. 8, 0. 7, 0. 65, 0. 6, 0. 59	9	2 15, 1. 8, 1. 2, 0 95, 0. 8, 0. 7, 0. 65, 0. 6, 0. 5
Msp I**	* 4	7	2. 8, 2 0, 1. 8, 1. 35, 1. 0, 0. 85, 0. 6	7	2. 8, 2 0, 1. 8, 1. 35, 1. 0, 0. 85, 0. 6

表示该种酶切点在两系银鲫间存在差异;**表示该种酶切点较多,某些小片段已经丢失



图 1 部分限制性内切酶的酶切电泳图谱 Fig. 1 The electrophoresis patterns of some restriction fragments

2.2 E系和 D 系银鲫 mtDNA 的酶切图谱构建

根据单酶切结果,选择具有一个切点的 *Nsi* I 和具有两个切点的 *Pst* I 两种酶分别与 其它 17 种切点数在 5 以下的内切酶组合,对两系鱼 mtDNA 进行双酶解;对切点数目较多 的几种酶,另选 *Bgl* I 与之组合双酶切,所得酶切片段结果见表 2。由表 2 数据并结合对 不完全酶切片段的分析构建了 E 系和 D 系银鲫的 mtDNA 19 种酶的 41 个位点的酶切图谱 (图 2)₉₉ 图中圆内所标切点为该系银鲫所特有的酶切位点₂₉ House. All rights reserved. http://

4期

表2 E系和D系银鲫 mtDNA 双酶酶切片段大小

Tab.2 The sizes of the restriction fragments of mtDNA from

silver crucian carp E clone and D clone by double enzyme digestion

	E 系		D 系				E 系	D 系	
限制酶	切点数	片段大小(kb)	切点数	片段大小(kb)	限制酶	切点数	片段大小(kb)	切点数	片段大小(kb)
Apa I /Nsi I	4	9. 0, 4. 7, 1. 8, 1. 1	4	9. 0, 4. 7, 1. 8, 1. 1	Apa[/Pst]	4	6. 5, 4. 6, 4. 4, 1. 1	4	6. 5, 4. 6, 4. 4, 1. 1
BamH [/Nsi]	3	9. 3, 3. 7, 3. 6	4	6. 2, 3. 7, 3. 6, 3. 1	BamH [/ Pst [4	13. 0, 2 5, 1. 9	5	6. 8, 4. 3, 2. 5, 1. 9, 1. 1
Bgl I /Nsi I	2	9. 4, 7. 2	4	7. 2, 5. 2, 2. 8, 1. 4	Bgl [/Pst]	3	12. 2, 2. 4, 2. 0	5	6. 2, 3. 2, 2. 8, 2. 4, 2 0
Bgl II / Nsi I	2	11. 0, 5. 6	2	11. 0, 5. 6	Bgl [] / Pst [3	12.2, 3.6, 0.8	3	12.2, 3.6, 0.8
BstE II / Nsi I	3	7. 3, 6. 9, 2. 4	3	7. 3, 6 9, 2.4	BstE II / Pst I	4	12. 1, 2 3, 2 1, 0.1	4	12. 1, 2. 3, 2. 1, 0 1
BstX [/Nsi]	2	15. 9, 0. 7	2	15. 9, 0. 7	BstX [/ Pst]	2	6. 7, 5. 5, 4. 4	2	6.7, 5.5, 4.4
EcoR [/Nsi]	5	7. 35, 7. 35, 1. 2, 0. 45, 0. 25	5	7. 35, 7. 35, 1. 2, 0. 45, 0. 25	EcoRI /PstI	6	7. 15, 4. 35, 3. 0, 1. 2, 0. 7, 0. 2	6	7. 15, 4. 35, 3.0, 1.2, 0.7, 0.2
EcoR V/Nsi I	2	14. 2, 2. 4	2	14. 2, 2. 4	EcoRV/Pst I	3	7. 2, 5. 0, 4. 4	3	7.2, 5.0, 4.4
Hind IIV Nsi I	6	7. 0, 4. 6, 2. 4, 1. 2, 0. 8, 0. 6	6	7. 0, 4. 6, 2. 4, 1. 2, 0 8, 0. 6	Hind IIV Pst I	7	11. 6, 2. 4, 0. 8, 0. 8, 0. 4, 0. 4, 0. 2	7	11. 6, 2. 4, 0. 8, 0. 8, 0. 4, 0. 4, 0. 2
Kpn I /Nsi I	2	10. 6, 6. 0	2	10. 6, 6. 0	Kpn [/ Pst]	3	12. 2, 2. 2, 2. 2	3	12. 2, 2. 2, 2. 2
Nco I /Nsi I	4	10 4, 2 5, 2.2, 1.5 5 1 3 6 2 7	4	10. 4, 2. 5, 2. 2, 1.5 1.36 2. 7	Nco [/Pst]	5	9. 6, 2. 5, 3. 0, 1. 4, 0. 1 5. 1. 4, 4. 2. 7	5	9. 6, 2. 5, 3. 0, 1. 4, 0.1 5. 1.4, 4.2, 7
Pvu II /Nsi I	7	2. 2, 1. 5, 0. 9,	7	2. 2, 1. 5, 0. 9,	Puu II / Pst I	8	2. 2, 0. 9, 0. 7,	8	2. 2, 0. 9, 0. 7,
Sac I /Nsi I	2	0.5 15.9,0.7	2	0 5 15. 9, 0. 7	Sac [/Pst]	3	0. 5 8. 1, 4. 4, 4. 1	3	0.5 8.1,4.4,4.1
Sal I /Nsi I	2	9. 9, 6. 7	2	9. 9, 6. 7	Sal I / Pst I	3	11.5, 4.4, 0.7	3	11.5, 4.4, 0.7
Sma] /Nsi]	4	14. 5, 0. 9, 0. 6, 0. 6	4	14. 5, 0. 9, 0. 6, 0. 6	Sma [/Pst]	5	5. 9, 4. 4, 4. 2, 1. 2, 0. 9	5	5. 9, 4. 4, 4. 2, 1. 2, 0. 9
Xba I /Nsi I	3	11. 5, 3. 9, 1.4	1	16 6	Xba [/ Pst [4	5. 1, 4. 4, 3. 6, 3. 5	2	12. 2, 4. 4
Sph I /Nsi I	2	16. 2, 0. 4	1	16 6	Sph [/ Pst]	3	7. 8, 4. 4, 4. 4	2	12. 2, 4. 4
Nsi I /Pst I	3	7. 4, 4. 8, 4. 4	3	7. 4, 4. 8, 4. 4	Apa I / Bgl I	4	6 5, 6.4, 2 6, 1.1	6	6. 2, 5. 2, 2. 4, 1. 4, 1. 1, 0. 3
Hind IIV Bgl I	6	11. 6, 2 0, 1. 2, 0 8, 0. 6, 0. 4	8	6 0, 2. 8, 2. 8, 2 0, 1. 2, 0. 8, 0. 6, 0. 4	Bgl [/Puu]]	7	4. 8, 2. 8, 2. 7, 2. 3, 0. 9, 0. 5, 0. 3	8	5. 0, 3. 1, 2. 7, 2. 3, 2. 0, 0. 9, 0. 5, 0 1

表 3 识别不同碱基数目的三种内切酶的酶切位点数目比较

Tab. 3 Comparison of the cleavage site numbers by different kind of endonucleases

that recognize different number of base pairs

the construction of the provide the provid								
酉	识别碱基数(r)	总位点数	共有位点数					
6 碱基	6	122	1 16					
5 碱基	16/3	14	12					
4 碱基	4	32	32					

注:"总位点数"为 m_{*}+ m_{*}," 共有位点数"为 2m_{*} ◎ 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

2.3 E、D 两系银鲫的遗传距离 根据酶切位点的异同可以 推算两系银鲫 mtDNA 分子之间 的同源程度。这两种分子各有 84 个可观察到的有效位点.其中 识别不同碱基数目的酶酶切所 得片段数目见表 3。按照 Nei (1987)的公式,先以 r=6的数 据按公式(1)和(2)求得它们之 (AP^a 间的序列差异 P1= 0.008 37. 再 根据公式(3) 经3-4个循环求 出三种识别不同碱基数目酶的 最大相似值 P= 0.010 118. 由公 式(4) 算得 d = 0.010 87 ±0.000012。这样,如果按照 Brown (1983) 建议的哺乳动物 mtDNA 碱基突变率为每百万年 2% 来计算 则两系银鲫的分歧 大约发生在 267ka 前: 而如果按 曾晴 贤¹⁾ 建议的台湾缨 口鳅 mtDNA 的碱基突变率为每百万 年3.3%的话,则E系和D系银 鲫的分歧大约发生在 165ka 前。

3 讨论与结论

3.1 传统的遗传学观点认为, 雌核发育的单性物种由于缺乏 基因重组和有意突变的积累,似 乎步入了进化的死胡同,是"短 命的"(Muller, 1964)。近年来, 有关单性鱼类和两栖动物的 mtDNA 酶切图谱及序列分析的 研究表明,以杂种生殖方式繁殖 的 Poeciliopsis 属的单性鱼至少



有十万年的演化历史(Quattro *et al*, 1992); 以雌核发育生殖的钝口螈(Ambystoma)有大约4 —5百万年的进化历程(Spolsky *et al*, 1992; Hedges *et al*, 1992)。银鲫作为可进行

¹⁾ 曾晴贤, 1992. 台湾缨口鳅之线粒体基因组和台湾产平鳍鳅科鱼类之分子演化的研究. 博士论文

^{© 1994-2012} China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

雌核发育生殖的两性型种群(桂建芳,1997),可能有更为复杂的起源和进化历史。本文研究的 E 系和 D 系银鲫是从黑龙江方正县双凤水库天然群体中挑选出来的两个有代表性的雌核发育系,一个已作为优良养殖品种被广泛用于生产养殖,一个也是我们育种研究养殖的珍贵材料。从本研究 mtDNA 的 25 种限制性内切酶的酶切图谱分析已在这两个雌核发育系间揭示出 16 万多年的分歧历史来看,银鲫的天然群体以及其它地方品系的进化历史可能比这还要长。

3.2 蛋白电泳技术在检测不同物种、同一物种不同群体之间的遗传变异中已被证明是一项极为重要的技术,但由于蛋白质属于基因表达加工后产物,因此这项技术也存在着一定的局限性。由于真核生物基因组中存在大量的重复序列,致使许多突变的基因不一定能够被表达为一种变异的蛋白;此外,蛋白电泳技术所检测的只是那些采用组织化学染色能够检测到的具有表达活性的基因之间的产物差异,而这类基因仅占整个基因组的一小部分。mtDNA 作为细胞质中独立的基因组,又为母性遗传,有其独特的进化历史。因此从mtDNA 水平上比较发现同一物种不同群体之间稳定的遗传标记将更为直接、可靠的多(Ferguson, 1994)。

3.3 本研究的主要意义在于从 25 种限制性内切酶酶切分析中,发现了包括 Ava II、 BamH I、Bgl I、Sph I、Xba I 这 5 种内切酶在 E 系和 D 系银鲫中存在酶切位点差异。因此,这一研究不仅构建了这两个银鲫雌核发育的 mtDNA 酶切图谱,为进一步探讨银鲫及 单性脊椎动物的进化奠定了基础,而且为银鲫育种及银鲫复合种的鉴定及其遗传背景分 析提供了明确的分子遗传标记。

参考文献

朱蓝菲, 蒋一, 1987. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用. 水生生物学报, 11(2): 105-111

朱蓝菲,蒋一,1993. 银鲫不同雌核发育系的生物学特征比较研究. 水生生物学报,17(2):112-120

桂建芳, 1989. 单性脊椎动物的进化遗传学. 自然杂志, 12(2): 116-121

桂建芳, 1997. 银鲫天然雌核发育机理研究的回顾与展望. 中国科学基金, 11(1): 11-15

蒋一 ,梁绍昌,陈本德等,1983. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学集刊,8(1):1-16 樊连春,崔建勋,余其兴,1994. 鳙鱼线粒体 DNA 的限制性内切酶图谱. 武汉大学学报,1:121-125

Brown W M, 1983. Evolution of Animal Mitochondrial DNAs. In: Nei M, Koehn R K ed. Evolution of Genes and Proteins. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 62–28

Ferguson M, 1994. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. Rev Fish Biol Fish, 4: 351-373

Hedges S B, Bogart J P, Maxson L R, 1992. Ancestry of unisexual salamanders. Nature, 356: 708-710

Muller H J, 1964. The relation of recombination to mutational advance. Mutat Res, 1:2-9

Nei M, 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press, 1-105

Quattro J M, Avise J C, Vrijenhoek R C, 1992. An ancient clonal lineage in the fish genus Poeciliopsis (Atheriniformes: Poeciliidae). Proc Natl Acad Sci USA, 89:348-352

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Long Island, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-75

Spolsky C M, Phillips C A, Uzzell T, 1992. Antiquity of clonal salamander lineage revealed by mitochondrial DNA. Nature, 356: 706-708

FAN Lian- chun, LAI Yu- peng, ZHU Lan- fei, LIANG Shao- chang, GUI Jian- fang

 $({\it State Key \ Laborat ary \ ff \ Freshwater \ Ecology \ and \ Biotechnology, \ Institute \ ff \ Hydrobiology, }$

The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

Abstract Oocytes (female) and livers (male) from E clone (8 female, 2 male) and D clone (9 female, 1 male) of silver crucian carp were collected from Guanqiao experiment center in Institute of Hydrobiology of Chinese Academy of Sciences in April 1996. The mitochondrial DNAs from the two different clones (E and D clones) of gynogenetic silver crucian carp were isolated and digested with 25 restriction endonucleases: Apa I, Ava II, BanH I, Bgl I, Bgl I, Bgl I, BstE II, BstX I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Hinf I, Kpn I, Msp I, Nco I, Nsi I, Pst I, Pvu II, Sac I, Sal I, Sma I, Sph I, Sp I, Sty I, Sty I, Xba I, Xho I. Physical maps of the restriction endonucleases cleavage sites on the mtDNAs of the two clones of silver crucian carp were drawn according to the numbers and sizes of the fragments by single and double digestion, which include total 41 cleavage sites from 19 endonucleases. All of the endonucleases produce 1—10 fragments except Xho I which has no cut site in both fish mtDNAs. Comparing the digestion results, we found 5 restriction endonucleases (Ava II, BanH I, Bgl I, Sph I, Xba I) with cleavage site differences. These differences can be used as the genetic marker for the two different clones of silver crucian carp in genetic breeding practice. Using the results of the endonucleases digestion, the homologous extent between the two fish clones can be calculated. The basic substitution rate of the two fish clones is P= 0.010 118, which shows the divergence date of the two fish clones is probably 267 thousand years or 165 thousand years ago.

Key words Gynogenetic Carassius auratus gibelio Restriction endonuclease mtDNA Genetic marker Subject classification number Q75