

文章编号:1005-8737(2000)01-0012-04

用 RAPD 方法分析太湖大银鱼、 太湖新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系

夏德全, 曹 莹, 吴婷婷, 杨 弘

(中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘 要: 1996~1997年2年中在太湖6个水域采集到大银鱼(*Protosalanx chinensis*)、太湖新银鱼(*Neosalanx reganius*)和寡齿新银鱼(*Neosalanx oligodontis*), 并发现其中有2个样品的 RAPD 图谱与其它样品的图谱有很大差异, 进一步的 DNA 分析结果表明, 这2个样品不属于大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼的其它种银鱼, 表明太湖中可能存在5种银鱼。

关键词: 太湖; 大银鱼; 太湖新银鱼; 寡齿新银鱼; 亲缘关系

中图分类号: Q959.466

文献标识码: A

银鱼是属于鲑形目(Salmoniformes)、银鱼科(Salangidae)的一类小型鱼类^[1]。身体透明, 除性成熟的雄性个体臀鳍基部有1列臀鳞外, 通体无鳞。由于银鱼体型细小, 在分类鉴定时存在困难。朱成德指出^[2], 太湖中存在大银鱼(*Protosalanx chinensis*)、太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)、寡齿新银鱼(*Neosalanx oligodontis*)和雷氏银鱼(*Neosalanx reganius*)。大银鱼和太湖新银鱼在太湖的湖湾及敞水区广泛分布; 寡齿新银鱼分布在一些水草较多的湖湾, 但不见于大太湖的敞水带; 雷氏银鱼虽然数量极少, 但在太湖中的分布区也相当广泛。张玉玲研究表明太湖产4种新银鱼^[3]。周伟确证引入滇池的新银鱼为2个种, 即太湖新银鱼和近太湖新银鱼(*N. pseudotaihuensis*), 只不过数量上太湖新银鱼占绝对优势, 而後者的数量极少, 二者比例为19:1^[4]。这些工作表明太湖中存在4种以上银鱼。我们在1996年11月和1997年5月和9月分别在太湖的东西山银鱼繁殖区、太湖西北部的宜兴

滩、三山湖、贡湖、以及太湖的东部和南部共6个水域取样, 并用 RAPD 技术分析了其中大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系, 同时还发现有个别样品的核基因组与太湖中已知的几种银鱼有显著的差异。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1996年11月、1997年5月和9月, 3次在太湖6个区域采集银鱼样品, 分别得到大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼, 但未采集到雷氏银鱼。每种银鱼在每个采样水域分别采集30尾, 而后将样品全部置于液氮中, 运回实验室, 直至提取 DNA。所选取的6个采样片基本上代表了银鱼在太湖中的主要分布区域。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂和仪器 研究所用随机引物(Kit Z 中的1-20号及Kit A中的4号)是美国 Operon 公司产品; Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等是华美生物工程公司产品。PCR 仪系美国 PE 公司的 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480。

1.2.2 银鱼 DNA 的制备 每尾银鱼各取约 100

收稿日期: 1998-11-16

基金项目: 农业部科学基金资助项目(渔95-A-96-01-04)

作者简介: 夏德全(1938-), 男, 上海市人, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心研究员, 博士生导师, 从事鱼类遗传育种、生物技术研究。

mg 肌肉组织,按《分子克隆》的方法提取 DNA^[5],并用紫外分光光度计测量 DNA 样品的质量浓度和纯度,再稀释至 10ng/ μ L。置于 4℃ 保存备用。

1.2.3 RAPD 反应 按 Williams 等的方法进行^[6]。

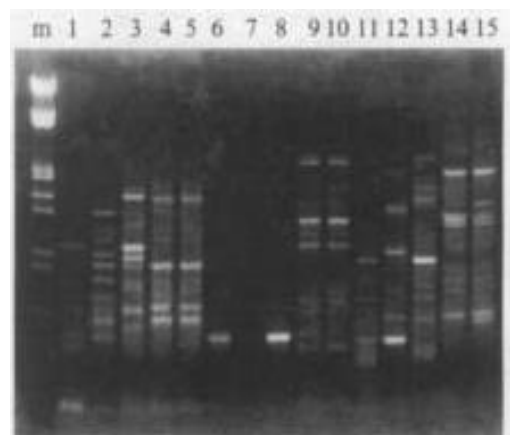
1.2.4 分析方法 根据 RAPD 产物的电泳带型,进行群体内和群体间的比较分析。在相同的迁移率上,出现的带记为 1,未出现的带记为 0,按公式 $S_{xy} = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$ 计算个体间遗传相似性指数,式中 n_{xy} 是个体 x 和 y 的共有带数, n_x 和 n_y 分别是个体 x 和 y 的扩增带数^[7]。

群体内的相似性指数(S)是群体内所有的两个个体间相似指数的平均值。群体间的遗传相似性指数(S_{ij})为群体 i 中的个体和群体 j 中的个体随机组合所得相似指数的平均值^[7]。用公式 $D = 1 - S$ 计算群体间的遗传距离。统计时仅记录清晰稳定的扩增带。

2 结果

首先对采自上述 6 个区域的大银鱼、太湖新银鱼以及采自 2 个区域的寡齿新银鱼进行 RAPD 分析。在对大银鱼、太湖新银鱼进行群体分析时,发现大银鱼 RAPD 图谱中第 9 号样品(No. 9)的图谱以及太湖新银鱼图谱中的第 8 号样品(No. 8)分别与其它样品的图谱差异较大。因此,将这 2 个样品与大银鱼、太湖新银鱼、寡齿新银鱼的混合样品共同比较分析,以探讨它们之间的关系。在所采用的引物中,除 OPZ02 和 OPZ18 没有扩增产物之外,其它每个引物的扩增产物在 5 个样品间都呈现出明显的差

异。图 1 显示了引物 OPA04、OPZ12 和 OPZ19 对样品 No. 9、No. 8 以及 3 种已知银鱼混合样品的扩增图谱,可以发现它们的扩增产物在样品间呈现显著的差异。根据扩增结果计算出它们之间的遗传相似性指数和遗传距离(表 1),表中也显示出样品间遗传相似性指数和遗传距离的显著差异。



(m: λ DNA/EcoRI + HindIII, 1, 6, 11: No. 9; 2, 7, 12: No. 8; 3, 8, 13: 大银鱼混合样品 Mixed sample of *P. chinensis*; 4, 9, 14: 太湖新银鱼混合样品 Mixed sample of *N. taihuensis*; 5, 10, 15: 寡齿新银鱼混合样品) Mixed sample of *N. oligodontis*.)

图 1 引物 OPA04(1~5)、OPZ12(6~10)、OPZ19(11~15)对样品 No. 9、No. 8 以及 3 种银鱼扩增的 RAPD 图谱

Fig. 1 RAPD patterns of No. 9, No. 8, samples of *P. chinensis*, *N. taihuensis* and *N. oligodontis* generated by primers OPA04 (1 - 5), OPZ12 (6 - 10), and OPZ19 (11 - 15)

表 1 No. 9、No. 8、大银鱼、太湖新银鱼、寡齿新银鱼之间的遗传相似性指数和遗传距离*

Table 1 Genetic similarity indices and genetic distances between No. 9, No. 8, *P. chinensis*, *N. taihuensis* and *N. oligodontis* *

样品 Sample	No. 9	No. 8	大银鱼 <i>P. chinensis</i>	太湖新银鱼 <i>N. taihuensis</i>	寡齿新银鱼 <i>N. oligodontis</i>
No. 9	—	0.366	0.757	0.357	0.400
No. 8	0.634	—	0.276	0.571	0.377
大银鱼 <i>P. chinensis</i>	0.243	0.724	—	0.314	0.327
太湖新银鱼 <i>N. taihuensis</i>	0.643	0.429	0.686	—	0.785
寡齿新银鱼 <i>N. oligodontis</i>	0.600	0.623	0.673	0.215	—

注:表中上三角中的数字表示遗传相似性指数,下三角中的数字表示遗传距离。Data above the diagonal represent the genetic similarity indices and below the diagonal represent the genetic distances.

用 UPGMA 法进行聚类分析,构建遗传相似性

指数聚类图见图 2。

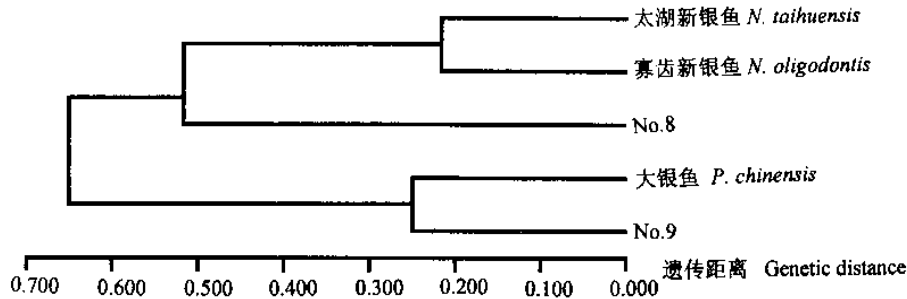


图 2 样品 No.9、No.8、大银鱼、太湖新银鱼、寡齿新银鱼的遗传距离聚类图

Fig.2 Dendrogram of 2 unknown samples No.9, No.8, and *P. chinensis*, *N. taihuensis* and *N. oligodontis* based on their genetic distances

3 讨论

根据表 1 的结果发现,在大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼之间,大银鱼和其它 2 种银鱼的遗传相似指数很小,分别是 0.314 和 0.327;太湖新银鱼和寡齿新银鱼的遗传相似性指数是 0.785。相应地,在构建的遗传相似性指数聚类图上(图 2),太湖新银鱼和寡齿新银鱼首先汇成 1 支,大银鱼在另外的 1 支。这表明太湖新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系较相近,而大银鱼与新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系较远。在银鱼的分类学上,太湖新银鱼和寡齿新银鱼都是新银鱼属(*Neosalanx*)内种,大银鱼则属于大银鱼属(*Protosalanx*)^[9]。我们的研究结果与 3 种银鱼的形态分类是一致的。

在对东西山、太湖西北部、东部和南部 4 个群体的大银鱼和太湖新银鱼进行分析时,发现 No. 9 和 No. 8 分别与大银鱼和太湖新银鱼的扩增结果有较大的差异(图 1),以至于不能用种内的差异来解释。朱成德认为太湖中存在大银鱼、太湖新银鱼、寡齿新银鱼和雷氏银鱼^[2]。那么是否可能在操作过程中将寡齿新银鱼的样品混淆其中,或者可能是其它种银鱼呢?在我们用 21 个引物对 No. 9、No. 8、大银鱼混合样品、太湖新银鱼混合样品、寡齿新银鱼混合样品的比较研究后,结果排除了把寡齿新银鱼混淆其中的可能。从表 1 中可以发现, No. 9 与大银鱼之间的遗传相似性指数是 0.757, 小于太湖新银鱼和寡齿新银鱼之间的相似指数,说明 No. 9 与大银鱼之间的差异应属于种间差异;它与太湖新银鱼、寡齿新银鱼之间的遗传相似性指数分别是 0.357 和 0.400, 则说明 No. 9 与这 2 种银鱼之间的亲缘关系

比属内种间关系更为遥远。与 No. 9 的情形相似, No. 8 与太湖新银鱼、大银鱼、寡齿新银鱼之间的遗传相似性指数分别是 0.571、0.276 和 0.377, 表明 No. 8 是不同于已知的 3 种银鱼的一种银鱼。除此之外, No. 9 和 No. 8 之间的遗传相似性指数也只有 0.366, 因此这 2 个样品理应属于不同的种, 根据遗传相似性指数和遗传距离, 这 2 种鱼应不在同一属内。

我们的研究结果表明, 在太湖中似存在 5 种银鱼, 在本研究中的 6 个采样区域中, 大银鱼和太湖新银鱼在每个区域都能够采到, 寡齿新银鱼仅在东部和南部水域采到, 此情形完全与这 3 种银鱼在太湖中的分布吻合; No. 8 采自三山水域, No. 9 采自东部水域。据朱成德等^[2]报道, 雷氏银鱼分布于大太湖、东太湖以及三山湖一带, 数量极为稀少; 邓思明等在 1992~1994 年间对太湖进行鱼类调查时, 从外部形态上发现 2 种不同于大银鱼、新银鱼和寡齿新银鱼的银鱼, 被分别称为 sp. 1 和 sp. 2; 张玉玲研究表明太湖中存在着 4 种以上银鱼^[3]。结合本实验的结果表明, 在太湖中存在 5 种银鱼, 但具体种的确定, 尚待进一步的研究鉴定。

参考文献:

- [1] 张开翔. 关于银鱼科系统分类位置的初步探讨[A]. 见: 江苏省海洋湖沼学会海洋湖泊科学文集[C], 北京: 农业出版社, 1987.
- [2] 朱成德, 钟瑾世. 太湖银鱼种群结果与数量变动的调查[A]. 见: 太湖水产资源调查材料汇编(1980 年~1981 年)[C], 1980. 1~15.
- [3] 张玉玲. 中国新银鱼属 *Neosalanx* 的初步整理及其一新种[J]. 动物学研究, 1987, 8(3): 277~286.
- [4] 周 伟, 谢庆春. 两种新银鱼卵膜表面的亚显微结构研究[J].

- 海洋与湖沼, 1991, 22(1): 93-94.
- [5] J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁, 等译. 北京: 科学出版社, 1996. 464-467.
- [6] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18; 6 531-6 535.
- [7] Bardakci F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification[J]. Heredity, 1994, 73: 117-123.
- [9] 朱松泉. 中国淡水鱼类检索[M], 南京: 江苏科技出版社, 1995. 14-16.

Study on lineages of *Protosalanx chinensis*, *Neosalanx taihuensis* and *N. oligodontis* in Taihu Lake with RAPD technique

XIA De-quan, CAO Ying, WU Ting-ting, YANG Hong

(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: *Protosalanx chinensis*, *Neosalanx taihuensis* and *N. oligodontis* were collected from 6 sampling sites of Taihu Lake in 1996 and 1997. Among these there were two individuals whose RAPD patterns were appreciably different from those of the others. And further analyses demonstrated that the two individuals should belong to two different Salangid species other than the three species mentioned above. It is therefore speculated based on the research results that in Lake Taihu there exist at least five but not four species of Salangid fishes.

Key words: Taihu Lake; *Protosalanx chinensis*; *Neosalanx taihuensis*; *N. oligodontis*; lineage