

绥芬河三块鱼属鱼类 和东北雅罗鱼亲缘关系的 RAPD 分析

陈金平^{1,2}, 梁利群¹, 孙效文¹, 董崇智¹, 赵文阁², 陈 辉²

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 哈尔滨师范大学, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘 要:利用 RAPD 技术对绥芬河水系三块鱼属 (*Tribolodon*) 的金滩头、黑滩头和雅罗鱼属的东北雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii* Dybowski) 进行属间、种间遗传物质相似性分析。样品取于溯河生殖洄游期(4~6月)。结果表明, 金滩头和黑滩头种间的 RAPD 指纹图谱带型差异显著, 平均带纹相似系数为 0.30, 遗传距离为 0.70。东北雅罗鱼与金滩头和黑滩头属间的平均带纹相似系数分别为 0.13 和 0.16, 遗传距离为 0.87 和 0.84。根据绥芬河水系金滩头和黑滩头间的遗传距离(0.70), 将二者划分为 2 个不同物种, 即珠星三块鱼 (*Tribolodon hakonensis* Günther) 和三块鱼 (*T. brandti* Dybowski)。

关键词:金滩头; 黑滩头; 东北雅罗鱼; 亲缘关系; RAPD

中图分类号:Q503

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)01-0001-04

在绥芬河水系雅罗鱼属 (*Leuciscus*) 鱼类中, 除陆封型的东北雅罗鱼 (*L. waleckii* Dybowski) 外, 另有 1 个种在分类上称三块鱼 (*L. brandti*)^[1] 或滩头雅罗鱼 (*L. brandti*)^[2], 其在绥芬河有 3 个形态相近又难以区分的生殖洄游群体, 当地渔民根据其洄游时间和体色的差异分别称之为金滩头、银滩头和黑滩头。

陈宜瑜^[2]根据其鳞片的放射肋、口位及侧线鳞数将其从雅罗鱼属 (*Leuciscus*) 中划分出来, 另列三块鱼属 (*Tribolodon*), 并将绥芬河水系的这 3 个洄游群体划归该属。关于它们的生物学、生殖群体结构、生态学等方面已有较详细的报道^{[3][1]}; 但其分类学地位一直存在争议。任慕连^[4]将这 3 个洄游群体划归为 1 个种, 即三块鱼 *T. brandti* (Dybowski); 尹家胜^[1]亦认为是 1 个种, 并称之为滩头雅罗鱼 *L. brandti* Dybowski。他根据标本测量性状认为该种

只有金滩头和黑滩头 2 个洄游群体, 而银滩头仅是黑滩头的亚成体; 而董崇智^[3]和张觉民^[5]认为金滩头和黑滩头应划归为 2 个种, 前者为珠星雅罗鱼 *L. hakonensis* Günther, 后者为滩头雅罗鱼。鉴于该物种在分类上一直存在较大争议, 本研究采用分子生物学方法, 探讨该物种不同洄游群体间的亲缘关系及其分类地位, 为该物种的分类提供借鉴依据。

1 材料和方法

1.1 样本鱼

金滩头和黑滩头于溯河生殖洄游期(4~6月) 采自黑龙江省绥芬河, 其中金滩头 20 尾(3~4 龄), 黑滩头 20 尾(3~4 龄), 东北雅罗鱼 10 尾(1⁺~2 龄)。在金滩头和黑滩头洄游期间采到婚姻色较淡的鱼 3 尾, 未发现银滩头个体。

1.2 基因组 DNA 的提取

取液氮冻存的上述鱼的肝组织约 5 g, 加入 DNA 提取裂解液 50 ml, 制成匀浆, 加入蛋白酶 K 至终质量浓度 300 μg/ml, 50 ℃ 温育 3 h, 加 1 倍体积苯酚/氯仿重复抽提 2 次, 取上清液, 再加 2 倍体积无水乙醇沉淀, 最后溶解于 1/10 TE(pH 8.0) 缓冲液中。

收稿日期:2001-07-23.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目。

作者简介:陈金平(1973-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类生态学的研究。E-mail: jinpings@hotmail.com

1) 尹家胜, 沈俊宝, 梁晓红, 等. 绥芬河滩头雅罗鱼种群生物学研究[J]. 中国水产科学研究院学报, 1991, 4(1): 7-16.

1.3 PCR反应及RAPD产物的分离

RAPD分析所用10 bp随机引物(C+G 60%~70%),分别购自 Operon 生物工程公司。RAPD扩增反应条件与 Williams 等^[6]报道的相似。反应混合物中含10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.001% gelatin, 4种dNTP各0.1 mmol/L, 0.2 μmol/L引物, 25 ng基因组DNA, 1 U TaqDNA聚合酶(购于美国 Promega 公司), 反应总体积为25 μl。于 GeneAmp PCR System9700 扩增仪上进行扩增, 每个反应45个循环, 每个循环包括93℃1 min, 36℃1 min, 72℃2 min, 45个循环前94℃预变性1 min, 45个循环后72℃延伸5 min。RAPD产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 0.5 μg/ml EB染色后用GDS8000凝胶成像系统(UVP公司)进行分析。

1.4 数据处理

个体间带纹相似系数参照 Nei 等^[7]的公式:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y),$$

式中: S_{xy} —物种 x 和物种 y 间的同源性; N_{xy} —RAPD 指纹图谱中个体 x 和个体 y 共有的带纹数; N_x, N_y —分别为个体 x 和个体 y 各自可分辨的带纹总数; 用 $1 - S_{xy}$ 衡量2物种间的遗传距离指数。

2 结果

2.1 RAPD分析

从 OPC、OPN 和 OPH 3 组随机引物中挑选出扩增效果较好的 OPC-01~06, OPC-08~12, OPC-15、16, OPC-19、20, OPN-01~09、11、17 为引物对3种鱼进行 RAPD 扩增, 获得了3种鱼的基因组指纹图谱(图1、2), 统计结果见表1。从3种鱼的23组指纹图谱中可以看出, RAPD 显示出丰富的多态性。共获得356条DNA片段(平均每个引物15.5条), 其中金滩头共获得112条扩增片段, 黑滩头共获得132条扩增片段, 东北雅罗鱼共获得112条扩增片段, 金滩头和黑滩头共享36条扩增片段, 金滩头和东北雅罗鱼共享14条扩增片段, 黑滩头和东北雅罗鱼共享19条扩增片段, 金滩头、黑滩头和东北雅罗鱼共享4条扩增片段。扩增出的片段均为0.1~5.0 kb, 个别片段小于0.1 kb, 23个引物的扩增反应均产生了多态性的DNA片段, 各种群平均每一引物所获得的带纹数为: 金滩头4.9条, 黑滩头5.7条, 东北雅罗鱼4.9条。从 RAPD 图谱带型来看, 3

种鱼的带型均较整齐, 带纹数相对比较平均, 共扩增出金滩头特异带66条, 黑滩头特异带81条, 东北雅罗鱼特异带83条。

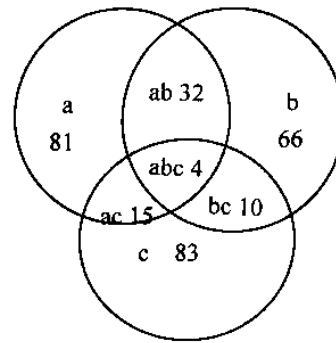


图1 23种引物的RAPD扩增片段数量分布

Fig. 1 Distribution of RAPD bands by 23 primers

a, b, c 分别表示黑滩头鱼、金滩头鱼和东北雅罗鱼 RAPD 扩增特异性片段数; ab—黑滩头和金滩头鱼 RAPD 扩增共有片段数; ac—黑滩头和东北雅罗鱼 RAPD 扩增共有片段数; bc—东北雅罗鱼和金滩头鱼 RAPD 扩增共有片段数; abc—金滩头、黑滩头和东北雅罗鱼 RAPD 扩增共有片段数

a, b and c represent special RAPD bands of black beachhead fish, gold beachhead fish and *L. waleckii* Dybowski, respectively; ab—sharing RAPD bands of black beachhead fish and gold beachhead fish; ac—sharing RAPD bands of black beachhead fish and *L. waleckii* Dybowski; bc—sharing RAPD bands of gold beachhead fish and *L. waleckii* Dybowski; abc—sharing RAPD bands of black beachhead and fish gold beachhead fish and *L. waleckii* Dybowski.

2.2 聚类分析

构建3种鱼的遗传相似性指数聚类图(图3)。从图3可见, 金滩头和黑滩头亲缘关系较近, 而与东北雅罗鱼亲缘关系较远。

3 讨论

(1)许多研究证明, 从 RAPD 所得到的 DNA 指纹图谱可以反映物种间亲缘关系的远近。因为2种生物的亲缘关系越近, 基因组内的同源序列越多, 用相同引物扩增产物的共有标记就越多, 反之亦然。本实验以 Operon 公司生产的 OPC 和 OPN 2 组共40个随机引物(OPC-01~20, OPN-01~20)对金滩头、黑滩头和东北雅罗鱼所进行的 RAPD 电泳结果表明, OPC 组引物比 OPN 组引物对这3种鱼具有更显著的扩增效果, 其中金滩头和黑滩头分别扩增出特异性片段66条和81条。RAPD 指纹图谱带型的差异反映出这3种鱼各有其独特的(种属特异性)

RAPD 扩增模式及显著不同的遗传组成。不同种类在基因组结构上存在的本质差异,说明两者之间未发生或仅进行过有限的基因交流。金滩头和黑滩头虽然在生殖洄游时间上存在重叠,我们用人工授

精的方法能产生成活的杂交后代,但 2 种群在自然分布区内及生殖洄游期间未发现有过渡种群存在,结合两者在遗传物质上的显著差异,说明在天然条件下两者仍保持生殖上的隔离。

表 1 金滩头、黑滩头和东北雅罗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 gold beachhead fish, black beachhead fish and *Leuciscus waleckii* Dybowski

种类 Species	金滩头 Gold beachhead fish	黑滩头 Black beachhead fish	东北雅罗鱼 <i>L. waleckii</i> Dybowski
金滩头 Gold beachhead fish	112	0.30	0.16
黑滩头 Black beachhead fish	0.70	132	0.13
东北雅罗鱼 <i>L. waleckii</i> Dybowski	0.84	0.87	112

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,对角线上的数字表示总 RAPD 条带数。

Note: Figures above the diagonal represent genetic similarity indices and below the diagonal represent the genetic distances; figures on diagonal represent total RAPD bands of each fish.

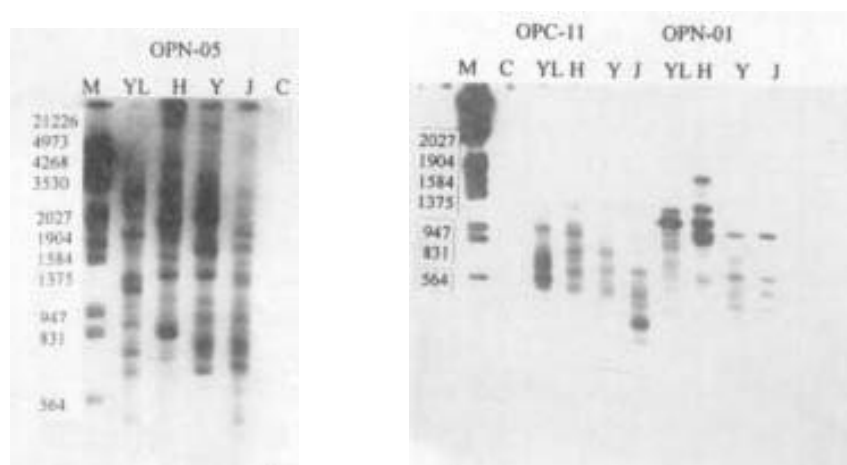


图 2 引物 OPN-05、OPC-11、OPN-01 对金滩头、黑滩头和东北雅罗鱼扩增的 RAPD 图谱

Fig.2 RAPD patterns of gold beachhead fish, black beachhead fish and *Leuciscus waleckii* Dybowski generated by primers

OPN-05, OPC-11 and OPN-01

M—Marker(λ DNA/HindIII and EcoRI); YL—东北雅罗鱼; H—黑滩头; Y—婚姻色较浅的不同个体; J—金滩头; C—不含模板 DNA 的空白对照。

M—Marker(λ DNA/HindIII and EcoRI); YL—*L. waleckii* Dybowski; H—black beachhead fish; Y—different species with slight marriage color; J—gold beachhead fish; C—Control, without template DNA.

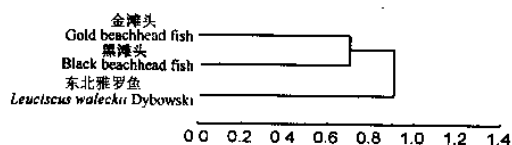


图 3 金滩头、黑滩头和东北雅罗鱼聚类图

Fig.3 Linkage distance of the three fishes

(2) 本实验测得金滩头和东北雅罗鱼之间遗传距离为 0.87、黑滩头和东北雅罗鱼种间的遗传距离为 0.84, 而金滩头和黑滩头之间的遗传距离为 0.70, 说明金滩头和黑滩头间的亲缘关系较近, 而两者与东北雅罗鱼的亲缘关系较远。这一结果从分子水平支持了陈宜瑜^[2]对三块鱼属和雅罗鱼属的划分。根据本实验结果, 结合其形态学性状, 金滩头应是珠星三块鱼 (*Tribolodon hakonensis* Günther), 而黑滩头应是三块鱼 (*Tribolodon brandti* Dybowski)。

(3)在本次调查中未发现银滩头。偶尔发现婚姻色相对较淡的个体。根据采到的几尾样品从引物 OPC-01 扩增的 DNA 图谱分析(图 2),其图谱与金滩头的相似,而从引物 OPC-11 扩增结果可见,其图谱与黑滩头的相似,初步推断婚姻色相对较淡的个体中既包括珠星三块鱼也包括三块鱼。而尹家胜等¹⁾将其列为黑滩头的亚成体。对这些个体归属尚有待于进一步研究确定。

参考文献:

- [1] 朱松泉. 中国淡水鱼类检索[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1995. 28-33.
- [2] 陈宜瑜. 中国动物志硬骨鱼纲鲤形目(中卷)[M]. 北京:科学出版社, 1998. 61-75.
- [3] 董崇智, 赵春刚, 金贞礼, 等. 绥芬河滩头雅罗鱼溯河生殖群体结构的探讨[J]. 水产学报, 1995, 19(4): 304-311.
- [4] 任慕连. 黑龙江鱼类[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社, 1981. 41-47.
- [5] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 1995. 86-91.
- [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] Nei Masatoshi, Li Wen-Hsiung. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76(10): 5 269-5 273.

Relationships of *Leuciscus waleckii* Dybowski and *Tribolodon* fishes in Suifen River by RAPD technique

CHEN Jin-ping^{1,2}, LIANG Li-qun¹, SUN Xiao-wen¹, DONG Chong-zhi¹, ZHAO Wen-ge², CHEN Hui²

(1. Heilongjiang River fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

Abstract: The genetic similarity indexes and genetic distances between *Leuciscus waleckii* Dybowski and two *Tribolodon* fishes-gold beachhead fish and black beachhead fish, were analyzed using RAPD technique. The fishes were collected from Suifen River (Heilongjiang Province) during their spawning anadromous migration (April to July). The results show that the RAPD patterns of gold beachhead fish were significantly different from those of black beachhead fish, and the average band sharing between gold beachhead fish and black beachhead fish is 0.30, and the corresponding genetic distances between them is 0.70. The similarity indexes of RAPD patterns of *L. waleckii* to the two fishes of *Tribolodon* are 0.13 and 0.16, respectively, with the corresponding genetic distances of 0.87 and 0.84, respectively. The conclusion is that gold beachhead fish and black beachhead fish in Suifen River are two different species which are *Tribolodon hakonensis* Günther and *Tribolodon brandti* Dybowski.

Key words: gold beachhead fish; black beachhead fish; *Leuciscus waleckii* Dybowski; relationship; RAPD

1)尹家胜, 沈俊宝, 梁晓红, 等. 绥芬河滩头雅罗鱼种群生物学研究[J]. 中国水产科学研究院学报, 1991, 4(1): 7-16.