

文章编号: 1004-7271(2004)02-0097-06

白斑狗鱼和黑斑狗鱼遗传关系初步研究

李思发, 乔德亮, 凌去非, 王成辉

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要 运用 RAPD 技术, 研究了分布于额尔齐斯河流域的白斑狗鱼(*Esox lucius*)和黑龙江流域的黑斑狗鱼(*Esox reicherti*)的遗传关系。结果表明(1)运用筛选的 34 个有效引物, 在白斑狗鱼群体内共扩增出谱带 257 条, 其中多态性带 130 条, 平均每个引物扩增谱带 7.56 条, 多态座位比例为 50.58%; 在黑斑狗鱼群体内共扩增出谱带 267 条, 其中多态性带 135 条, 平均每个引物扩增谱带 7.85 条, 多态座位比例为 50.56%。两种狗鱼间多态座位比例差异不显著($P > 0.05$)。(2)引物 S_{68} 在黑斑狗鱼群体内扩增出 1943bp 单态片段, 但在白斑狗鱼群体内没有出现, 故认为引物 S_{68} 扩增的 1943bp 片段可作为区别这两种狗鱼的遗传标记。(3)在两种狗鱼间, 遗传相似度是 0.8090, 遗传距离是 0.0125; 在种内个体间, 遗传相似度白斑狗鱼是 0.8171, 黑斑狗鱼是 0.8213, 遗传距离分别是 0.1829 和 0.1787, 香农氏遗传多样性指数分别是 0.1236 和 0.1241, 三个指标的种间差异均不显著($P > 0.05$)。

关键词 白斑狗鱼, 黑斑狗鱼, 遗传关系, RAPD

中图分类号: S917 文献标识码: A

Preliminary study on the genetic relationship between white spot pike *Esox lucius* and black spot pike *Esox reicherti*

LI Si-fa, QIAO De-liang, LING Qu-fei, WANG Cheng-hui

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract Genetic relationship between white spot pike (*Esox lucius*) in Eltrix River and black spot pike (*Esox reicherti*) in Helongjiang River in China was studied by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. (1) Using 34 effective primers, in white spot pike population, totally 257 bands were obtained, in which 130 bands were polymorphic, average bands per primer was 7.56, the percentage of polymorphic loci was 50.58%. In black spot pike population, totally 267 bands were obtained, in which 135 bands were polymorphic, average bands per primer was 7.85, the percentage of polymorphic loci was 50.56%. There was no significant difference between these two pikes in the percentage of polymorphic loci ($P > 0.05$). (2) Primer S_{68} produced a monomorphic band with molecular weight 1943bp in black spot pike population, but not in white spot pike population. Therefore, 1943bp of S_{68} could be considered as a genetic marker to distinguish these two pikes. (3) Between the two species of pike, genetic similarity, genetic distance was 0.8090 and 0.0125 respectively. Within species, the genetic

收稿日期 2003-12-25

基金项目: 上海水产大学——新疆农十师合作课题(科 03-03)

作者简介: 李思发(1938-), 男, 江苏镇江人, 教授, 博士生导师, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: lsf038@mail.online.sh.cn

similarity for the white spot pike was 0.8171, black spot pike was 0.8213; the genetic distance for the white spot pike was 0.1829, far black spot pike was 0.1787; the Shannon's index of genetic diversity for the white spot pike was 0.1236, for black spot pike was 0.1241, and there was no significant difference between these two pikes in above 3 indexes.

Key words: white spot pike (*Esox lucius*); black spot pike (*Esox reicherti*); genetic relationship; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

狗鱼科 (Esocidae) 属鲑形目 (Salmoniformes) 狗鱼亚目 (Esocoidei), 是北半球北部亚冷水性大型凶猛淡水鱼类, 仅含狗鱼属 (*Esox*) 一属。全世界共有狗鱼 7 种^[1], 我国有两种, 即白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 和黑斑狗鱼 (*E. reicherti*)。白斑狗鱼绵延地分布于亚洲、欧洲和北美洲的北极圈的周边地区, 在亚洲的分布比黑斑狗鱼略偏北, 约在北纬 46° 以北, 我国仅分布于新疆北部额尔齐斯河流域; 黑斑狗鱼分布于西伯利亚东南部、俄罗斯及欧洲大陆北部, 大多分布在北纬 43° 以北, 我国仅分布于黑龙江流域及附近地区。对白斑狗鱼和黑斑狗鱼已分别有一些形态学、生物学及遗传学的研究和报道^[2-10], 这两种狗鱼, 尚未见有遗传关系的研究。

从以往分类学研究知道, 两种狗鱼的主要区别是, 白斑狗鱼体侧有白色斑点, 适于水草丛生活; 黑斑狗鱼体侧有黑色斑点, 适于河道生活。在种内, Miller 等^[8]用微卫星标记技术研究北美白斑狗鱼四群体的亲缘关系, Brzuzan 等^[9]用限制性内切酶技术研究北美白斑狗鱼两群体 mtDNA 遗传变异情况, Senanan 等^[10]用微卫星标记技术研究北美和欧洲白斑狗鱼 20 个不同群体亲缘关系。白斑狗鱼分布于我国西北角, 黑斑狗鱼分布于我国东北角, 相距千里, 他们之间的亲缘关系如何? 本实验运用核 DNA 的 RAPD 分析技术予以探讨, 以期了解这两种狗鱼的遗传多样性特征和关系, 为其种质资源开发利用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

白斑狗鱼取自新疆额尔齐斯河流域, 黑斑狗鱼取自黑龙江流域, 各 12 尾成鱼。每条鱼取尾鳍 1 ~ 2g, 95% 酒精保存备用。

1.2 引物和试剂

引物购自上海生工 (Sangon) 生物工程有限公司。Taq 酶购自上海普飞生物工程有限公司。其它试剂如 dNTP 等购自上海华舜生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

参照金冬雁等^[11]。取尾鳍约 0.3g, 剪碎后加入 400 μ L STE 裂解缓冲液 (含 Tris-HCl 30mmol/L, pH = 8.0, EDTA 200 mmol/L, NaCl 50 mol/L) 10 μ L 20mg m/L 蛋白酶 K, 40 μ L 10% SDS, 摇匀后放入 56 $^{\circ}$ C 烘箱过夜 (约 14 ~ 16h)。加入等体积 (约 500 μ L) 饱和酚, 振荡摇匀 30 ~ 40min 直至界面消失, 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 10min。吸取上清液加入等体积饱和酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 振荡摇匀约 5min, 4 $^{\circ}$ C、10000r/min 离心 5min。吸取上清液加入等体积氯仿: 异戊醇 (24:1) 振荡摇匀约 5min, 4 $^{\circ}$ C、10000r/min 离心 5min。取上清液加入 2 倍体积的预冷无水乙醇过夜。吸出无水乙醇 37 ~ 40 $^{\circ}$ C 烘干, 加入 400 μ L 双重无菌水溶解, 加入 2 μ L RNA 酶 (25 mg/mL) 降解 RNA, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.2 PCR-RAPD 反应

参照 Williams 等^[12]。PCR 反应混合物中含 16.4 μ L 无菌水, 3 μ L 缓冲液 (含 Tris-HCl 100mmol/L, KCl 500 mmol/L, MgCl₂ 30 mmol/L, 0.01% 明胶, pH = 9.0) 1 μ L dNTP (2.5mmol/L) 2 μ L 引物 (5 μ mol/L) 2 μ L 基因组 DNA (约 25ng) 0.6 μ L Taq 酶 (2 IU/ μ L), 反应总体积外为 25 μ L, 稍离心再加入 30 μ L 石蜡油, 于 PE480

型 PCR 扩增仪上反应。循环程序为：先 94℃ 变性 5min，接着 94℃ 45s、36℃ 45s、72℃ 90s 循环 45 次，再 72℃ 延伸 10min，降温至 10℃ 约 5~10min，取出 4℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 扩增产物凝胶电泳

取 10 μ L 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶 (含适量 EB) 电泳，电泳缓冲液为 10 \times TBE (含 Tris-硼酸 0.045 mol/L, EDTA 0.001 mol/L, pH = 8.0)，电压为 5V/cm。电泳结束后用 Gene genius 型凝胶成像系统拍照、记录、分析。

1.4 数据处理和分析

群体内个体间遗传相似度 (I) = $2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ，式中 N_{xy} 为两个个体共有条带数， N_x 、 N_y 分别为 X 个体和 Y 个体各自条带数。个体间遗传距离 (D) = $1 - I$ ^[13]。 $I = 1$ 、 $D = 0$ 表示该引物扩增谱带在这两个个体间完全一致。反之 $I = 0$ 、 $D = 1$ 表示该引物扩增谱带在这两个个体间完全不一致。

群体间遗传距离 (D) = $-\ln [S_{ij} / (S_i S_j) \times 0.5]$ ^[14]。式中 S_{ij} 为群体间遗传相似度，表示群体 i 和群体 j 间所有配对个体相似系数的平均值， S_i 、 S_j 分别为群体 i 和群体 j 内所有配对个体相似系数的平均值。

群体内香农氏多样性指数 (Shannon's index of genetic diversity) : $H = -\sum (X_i \ln X_i) / N$ 。 X_i 为某一条带在某一群体中出现的频率， \ln 为自然对数， N 为所测座位数^[15]。

观察分析电泳谱带时，只统计清晰、重复性好的条带。有带计为 1，无带计为 0，再用 SYSTAT 软件统计分析^[16]。

2 结果

2.1 引物筛选

本实验共运用随机引物 46 个，其中能扩增出清晰、重复性好的条带的引物有 34 个，引物有效率为 73.91%。筛选出的 34 个有效引物及序列见表 1。

表 1 筛选出的 34 个有效随机引物及序列

Tab.1 Selected primers and their sequence

序号	引物编号	引物序列	序号	引物编号	引物序列
1	S ₄	GGACTGGAGT	18	S ₂₀₂	GGAGAGACTC
2	S ₅	TGCGCCCTTC	19	S ₂₀₄	CACAGAGGGA
3	S ₇	GGTGACGCAG	20	S ₂₀₅	GGGTTTGCA
4	S ₁₀	CTGCTGGGAC	21	S ₂₀₇	GGCAGGCTGT
5	S ₁₂	CCTTGACGCA	22	S ₂₀₈	AACGGCGACA
6	S ₂₇	GAAACGGGTG	23	S ₂₁₃	AGGACTGCCA
7	S ₂₉	GGGTAACGCC	24	S ₂₁₄	AATGCCGCAG
8	S ₃₀	GTGATCGCAG	25	S ₂₁₅	GGATGCCACT
9	S ₃₅	TTCCGAACCC	26	S ₂₁₆	GGTGAACGCT
10	S ₃₇	GACCGTTTGT	27	S ₂₁₇	CCAACGTCGT
11	S ₃₈	AGGTGACCGT	28	S ₂₁₈	GATGCCAGAC
12	S ₄₁	ACCGGAAGG	29	S ₂₂₀	GACCAATGGC
13	S ₅₁	AGGCCATTTG	30	S ₂₂₁	TGACGCATGG
14	S ₅₂	CACCGTATCC	31	S ₂₂₄	CCCCTCACGA
15	S ₆₂	GTGAGGCGTC	32	S ₂₂₆	ACGCCAGGT
16	S ₆₈	TGGACCGGTG	33	S ₂₂₇	GAAGCCAGCC
17	S ₂₀₁	GGGCCACTCA	34	S ₂₂₈	GGACGGCGTT

2.2 RAPD 扩增结果

在 34 个有效引物中，19 个引物呈现多态性，15 个引物呈现单态性，引物多态率为 55.88%，谱带片段在 300~2500bp 之间。

运用 34 个有效引物,在白斑狗鱼群体内共扩增谱带 257 条,其中多态带 130 条,单态带 127 条,平均每个引物扩增谱带 7.56 条,如把一条谱带看作一个基因座位,则多态座位比例为 50.58%;在黑斑狗鱼群体内共扩增谱带 267 条,其中多态带 135 条,单态带 132 条,平均每个引物扩增谱带 7.85 条,多态座位比例为 50.56%。两种狗鱼的多态座位比例差异不显著($P > 0.05$)。群体扩增谱带 1~14 条,个体扩增谱带 1~10 条。各引物扩增产物电泳谱带详情见表 2。

表 2 两种狗鱼不同引物 RAPD 反应扩增谱带

Tab.2 Amplified result using different primers in two pikes

白斑狗鱼(<i>Esox lucius</i>)				黑斑狗鱼(<i>Esox reicherti</i>)			
引物	总带数	共享带数	个体带数	引物	总带数	共享带数	个体带数
S ₄	10	2	4~8	S ₄	10	2	5~8
S ₅	8	4	5~8	S ₅	8	4	5~8
S ₇	5	5	5	S ₇	5	5	5
S ₁₀	6	1	3~5	S ₁₀	7	3	3~7
S ₁₂	9	1	2~5	S ₁₂	8	2	2~5
S ₂₇	10	1	2~8	S ₂₇	10	1	2~8
S ₂₉	8	8	8	S ₂₉	8	8	8
S ₃₀	10	2	4~7	S ₃₀	11	2	4~8
S ₃₅	10	1	3~4	S ₃₅	11	1	3~8
S ₃₇	10	2	5~7	S ₃₇	11	1	4~7
S ₃₈	8	8	8	S ₃₈	8	8	8
S ₄₁	9	9	9	S ₄₁	9	9	9
S ₅₁	6	6	6	S ₅₁	6	6	6
S ₅₂	11	1	1~7	S ₅₂	10	1	3~7
S ₆₂	9	9	9	S ₆₂	9	9	9
S ₆₈	6	4	4~6	S ₆₈	9	6	6~8
S ₂₀₁	11	5	5~9	S ₂₀₁	11	3	5~10
S ₂₀₂	11	1	3~8	S ₂₀₂	11	0	2~7
S ₂₀₄	14	0	4~8	S ₂₀₄	14	0	3~9
S ₂₀₅	7	7	7	S ₂₀₅	7	7	7
S ₂₀₇	5	5	5	S ₂₀₇	5	5	5
S ₂₀₈	7	7	7	S ₂₀₈	7	7	7
S ₂₁₃	4	4	4	S ₂₁₃	4	4	4
S ₂₁₄	6	6	6	S ₂₁₄	6	6	6
S ₂₁₅	8	3	4~8	S ₂₁₅	9	2	4~8
S ₂₁₆	6	6	6	S ₂₁₆	6	6	6
S ₂₁₇	7	2	2~5	S ₂₁₇	8	2	2~6
S ₂₁₈	4	4	4	S ₂₁₈	4	4	4
S ₂₂₀	1	1	1	S ₂₂₀	1	1	1
S ₂₂₁	7	4	4~7	S ₂₂₁	7	4	5~7
S ₂₂₄	1	1	1	S ₂₂₄	1	1	1
S ₂₂₆	6	1	2~6	S ₂₂₆	7	2	2~5
S ₂₂₇	7	3	3~6	S ₂₂₇	9	3	3~8
S ₂₂₈	10	3	5~9	S ₂₂₈	10	7	8~10
合计	257	127		合计	267	132	

2.3 RAPD 分子标记

在 19 个多态性引物中,发现引物 S₆₈在黑斑狗鱼群体内扩增出 1943bp 单态片段,但在白斑狗鱼群体内没出现该片段。这样,引物 S₆₈可作为这两种狗鱼群体的标记引物,片段 1943bp 可作为这两种狗鱼群体的遗传标记(图 1)。

2.4 遗传多样性指标

种内个体间的遗传相似度、遗传距离、香农氏遗传多样性指数平均值在白斑狗鱼分别是 0.8171、

0.1829、0.1236, 在黑斑狗鱼分别是 0.8213、0.1787、0.1241, 差异均不显著 ($P > 0.05$)。两种鱼种间的遗传相似度、遗传距离分别是 0.8090、0.0125。差异也不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

3 小结和讨论

3.1 白斑狗鱼和黑斑狗鱼的遗传多样性

自然界生物体都是在不断进化着, 而进化来源于变异。多态位点是进化中变异活跃的片段, 群体的多态座位比例、遗传相似度和遗传多样性指数综合反映了群体的遗传多样性、分化和变异的程度。本研究对两种狗鱼的遗传多样性分析结果显示, 白斑狗鱼种内上述三个指标分别是 50.58%、0.8171 和 0.1236, 黑斑狗鱼种内分别是 50.56%、0.8213% 及 0.1241%。

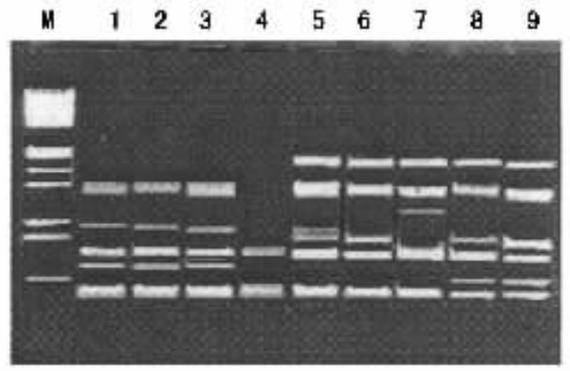


图 1 引物 S_{68} 在两种狗鱼的 RAPD 反应电泳图谱
Fig.1 RAPD pattern of two pikes generated by primer S_{68}
M 标记物 λ DNA /EcoRI + HindIII Marker, 3 ;
1-4 白斑狗鱼 5-9 黑斑狗鱼

表 3 不同引物得出的两种狗鱼的遗传相似度和遗传多样性指数

Tab.3 Genetic similarity and index of genetic diversity obtained from different primers in two pikes

白斑狗鱼 (<i>Esox lucius</i>)			黑斑狗鱼 (<i>Esox reicherti</i>)		
引物	遗传相似度	多样性指数	引物	遗传相似度	多样性指数
S_4	0.6679	0.2308	S_4	0.7303	0.1971
S_5	0.8216	0.1467	S_5	0.7438	0.2034
S_7	1.0000	0.0000	S_7	1.0000	0.0000
S_{10}	0.6210	0.2234	S_{10}	0.7550	0.1923
S_{12}	0.5402	0.2659	S_{12}	0.6742	0.2349
S_{27}	0.5878	0.2653	S_{27}	0.5713	0.2563
S_{29}	1.0000	0.0000	S_{29}	1.0000	0.0000
S_{30}	0.7854	0.1726	S_{30}	0.6391	0.2558
S_{35}	0.4767	0.3232	S_{35}	0.5485	0.2891
S_{37}	0.6552	0.2445	S_{37}	0.5584	0.2848
S_{38}	1.0000	0.0000	S_{38}	1.0000	0.0000
S_{41}	1.0000	0.0000	S_{41}	1.0000	0.0000
S_{51}	1.0000	0.0000	S_{51}	1.0000	0.0000
S_{52}	0.4775	0.2874	S_{52}	0.5985	0.2568
S_{62}	1.0000	0.0000	S_{62}	1.0000	0.0000
S_{68}	0.9252	0.0817	S_{68}	0.9054	0.1110
S_{201}	0.7832	0.1809	S_{201}	0.6994	0.2229
S_{202}	0.5131	0.3057	S_{202}	0.4379	0.3207
S_{204}	0.3013	0.3392	S_{204}	0.4236	0.3215
S_{205}	1.0000	0.0000	S_{205}	1.0000	0.0000
S_{207}	1.0000	0.0000	S_{207}	1.0000	0.0000
S_{208}	1.0000	0.0000	S_{208}	1.0000	0.0000
S_{213}	1.0000	0.0000	S_{213}	1.0000	0.0000
S_{214}	1.0000	0.0000	S_{214}	1.0000	0.0000
S_{215}	0.7640	0.2103	S_{215}	0.7548	0.1938
S_{216}	1.0000	0.0000	S_{216}	1.0000	0.0000
S_{217}	0.7104	0.2165	S_{217}	0.6604	0.2450
S_{218}	1.0000	0.0000	S_{218}	1.0000	0.0000
S_{220}	1.0000	0.0000	S_{220}	1.0000	0.0000
S_{221}	0.8432	0.1376	S_{221}	0.9387	0.0740
S_{224}	1.0000	0.0000	S_{224}	1.0000	0.0000
S_{226}	0.6804	0.2347	S_{226}	0.6675	0.2403
S_{227}	0.8340	0.1710	S_{227}	0.7121	0.2272
S_{228}	0.7942	0.1663	S_{228}	0.9065	0.0923
平均	0.8171	0.1236	平均	0.8213	0.1241

3.2 白斑狗鱼与黑斑狗鱼亲缘关系

传统形态学分类方法主要从体表斑点为白色或黑色来判别白斑狗鱼和黑斑狗鱼^[2-3,5]。但鱼类体表色斑除受遗传因子控制外,环境因子的影响也很大,故单单根据体表斑点为白色或黑色来划分物种的可靠性尚待验证。

本文用 RAPD 技术筛选 34 个有效引物研究白斑狗鱼和黑斑狗鱼两种鱼间亲缘关系,得出种间遗传相似度是 0.8090,遗传距离是 0.0125。这两种狗鱼为同一属鱼,由于地理隔离、生态环境的差异,使它们从形态到 DNA 水平上都出现差异。额尔齐斯河流域与黑龙江流域虽相距遥远,但纬度相似,气候相差不远,分化程度仍十分有限。要深入了解白斑狗鱼和黑斑狗鱼的种间亲缘关系,还有待于从其它方法,如传统形态、现代框架、养殖性能、染色体组型、同工酶以及这两种鱼的交配繁衍能力,后代表现等进行综合判别分析。

参考文献:

- [1] 伍汉霖,绍广昭,赖春福. 拉汉世界鱼类名典[M]. 基隆:水产出版社,1999.329.
- [2] 中国科学院动物研究所,中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所,新疆水产局. 新疆鱼类志[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1979. 14-15.
- [3] Craig J F. Pike: Biology and exploitation[M]. London: Chapman & Hall, 1996. 5-6.
- [4] 张弥漫,周家健. 狗鱼化石(*Esox Teleostei*)在中国的首次发现[J]. 古脊椎动物学报, 2002, 40(2): 81-96.
- [5] 尼科尔斯基. 黑龙江流域鱼类[M]. 北京:科学出版社,1960.84-94.
- [6] 任慕莲,郭焱,张仁铭,等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业[J]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 2002. 80-87.
- [7] 赵春刚,董家智,乌苏里江黑斑狗鱼种群生态学特征的研究[J]. 水产学杂志, 2001, 14(2): 61-65.
- [8] Miller L M, Kapuscinski A R. Microsatellite DNA makers reveal new levels of genetic variation in northern pike[J]. Trans Am, Fish Soc, 1996, 125(6): 971-977.
- [9] Brzuzan P, Luczynski M, Kuznia P A. Mitochondrial DNA variation in two samples of northern pike(*Esox lucius*) [J]. Aquacult Res, 1998, 25(7): 521-526.
- [10] Senanan W, Kapuscinski A R. Genetic relationships among populations of northern pike(*Esox lucius*) [J]. Can J Fish Aquat Sci, 2000, 57(2): 391-404.
- [11] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京:科学出版社,1996.464-467.
- [12] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [13] Nei M, Li N H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[M]. Proceeding of the National Academy Science, USA, 1979. 269-273.
- [14] Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprint[A]. DNA fingerprint approaches and applications[C]. Switzerland: Basel, 1990, 80, 113-126.
- [15] Wachira F N, Waugh R, Hackett C A, et al. Detection of genetic diversity in tea(*Camellia sinensis*) using RAPD markers[J]. Genome, 1995, 38: 201-210.
- [16] Wilkinson L. SYSTAT, The system for statistics[M]. Evanston IL, 1989.423-455.