

低等鲤科鱼类 RAPD 分析及系统发育研究

何舜平 王 伟 陈宜瑜

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 通过对鲤科鱼类 30 个个体所代表的 18 个种的随机扩增, 作者得到了大量有系统发育信息的 DNA 多态片段。通过 Rapdplot 程序将 DNA 的多态片段转换成遗传距离 ($d = 1 - S$, $S = 2N_xN_y / (N_x + N_y)$)。该遗传距离的矩阵经 PHYLIP 软件包中的 Neighbor (option = NJ) 程序处理后, 生成了低等鲤科鱼类代表属种的分支系统图。从该系统图可以看出: RAPD 分析方法在鲤科鱼类的系统发育研究中有一定的局限性, 它比较适合于亚科内属间系统发育的研究。结果显示鲴亚科并不是一个单元类群, 其中的马口鱼类和细鲫类各自形成单元群, 但这两个类群间的关系并不直接联系。在分析结果中, 分布于东亚的雅罗鱼亚科鱼类比鲴亚科鱼类更原始。

关键词: 鲤科, 系统发育, 分子进化, RAPD 分析

中图分类号: Q111 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)02-0101-06

鲤科鱼类是一个较大的淡水鱼类类群, 广泛分布于欧亚大陆、非洲和北美。在南美、澳洲和南极没有分布。该类群生物多样性最大的地区在东亚和东南亚。其分类、系统发育研究是长期困扰鱼类学界的问题。有关鲤科鱼类亚科的划分一直没有在系统发育上得到论证。因为缺乏自在离征, 人们在鲤科鱼类亚科划分时只是把共同离征较为明显的类群划为一个亚科, 而那些离征不明显的类群、属、种则被放入雅罗鱼亚科和鲴亚科。所以, 雅罗鱼亚科和鲴亚科的系统发育研究对整个鲤科鱼类系统发育的研究有重要的意义。一些学者常把雅罗鱼亚科和鲴亚科鱼类看作较为原始的鲤科鱼类, 陈湘莪等^[1]通过骨骼形态的比较, 在接受现有亚科作为单系类群的基础上对鲤科科下分类和系统关系进行了研究。其实, 低等鲤科鱼类是一个模糊的概念, 并未在分类学和系统学上有一个明确的定义。本文旨在运用 RAPD 方法对低等鲤科鱼类的系统发育加以研究。探讨雅罗鱼亚科和鲴亚科的单系性及系统发育关系。一般认为 RAPD 仅适用于较低分类单元的研究, 但也有作者使用 RAPD 的方法对较高的分类单元进行了研究。Halward^[2]等用 10 个引物对 29 个花生野生种基因组, 何舜平等^[3]运用 RAPD 的方法对五种鲤科鱼类进行的分析都说明了 RAPD 分析在较高分类单元(鲤科同一亚科中的属间)研究中与形态特征分析的结果也是相一致的。

收稿日期: 1999-01-20; **修订日期:** 1999-07-15

基金项目: 国家自然科学基金课题: 低等鲤科鱼类分子进化过程及系统发育研究, 批准号: 39500016。

作者简介: 何舜平(1962—), 男, 四川省泸州市人, 法国国家自然历史博物馆博士。现任中国科学院水生生物研究所副研究员。主要从事淡水鱼类的分类、系统进化和生物地理学研究。

1 材料与方法

1.1 材料 用于 RAPD 分析的 30 个个体分别代表 20 种鲤科鱼类, 标本采自广西、辽宁、四川、湖北等地。标本整体或肌肉组织用 95% 酒精固定并保存于 4℃ 的冰箱中备用。研究的种类分别为: 鲴亚科的马口鱼 (*Opsariichthys bidens* Gunther)、宽鳍鱮 [*Zacco platypus* (Temminck et Schlegel)]、侧条波鱼 (*Rasbora steineri* Nichols et Pope)、中华细鲫 (*Aphyocypris chinensis* Günther)、瑶山鲤 (*Yaoshanicus arcus* Lin)、稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus* Ye et Fu)、斑马鱼 (*Brahydanio rerio* Hamilton); 雅罗鱼亚科的鳊 [*Ochetobius elongatus* (Kner)]、鲮 (*Luciobrama bambusa* Richardson)、草鱼 [*Ctenopharyngodon idellus* (Cuvier et Valenciennes)]、青鱼 [*Mylopharyngodon piceus* Richardson]; 鲃亚科的细鲫 (*Rasborinus lineatus* Pellegrin); 鲃亚科的白甲鱼 [*Onychostoma sima* (Sauvage et Dabry)]; 二须鲃 (*Capoeta semifasciolata* Gunther); 野鲮亚科的墨头鱼 (*Garra pingi pingi* Tchang)、野鲮 (*Rectoris posehensis* Lin); 鳅亚科的桂林鳅 (*Gobiobotia guilingensis* Chen); 鮡亚科的似鮡 (*Pseudogobio vaillanti* Sauvage); 鲴亚科的银鲴 (*Xenocypris argentea* Günther) 和鲤亚科的三角中鲤 [*Mesocyprinus multitaeniata* (Pellegrin et Chevey)]。

1.2 方法 样本固定、总 DNA 提取用 Ausubel^[4] 的方法; 材料取自 95% 酒精固定标本的肌肉。PCR-RAPD 反应应用 Williams 等^[5] 的方法。所用引物为 Operon 公司产的第 v 组共 20 个随机引物, 引物序列见表 2。扩增反应的总体积是 20 μL, 其中包括: 2 μL 的 10x 反应缓冲液 (包括 15 mmol/L 的 MgCl₂); 四种核苷酸 dCTP, dGTP, dATP, dTTP 各 0.1 mmol/L; 0.2 μmol/L 的随机引物; 30 ng 模板 DNA; 1 U 的 TaqDNA 聚合酶。于 PCR 扩增仪上进行 40 个循环, 先 94℃ 预变性 3 min, 然后每个循环都是 94℃ 变性 45 s, 36℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 最后是 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后于紫外凝胶分析仪下记录。RAPD 电泳结果首先转换成 0, 1 数字矩阵然后由 RAPDPLOT 转换成遗传距离 ($d = 1 - S, S = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$), 然后用 PHYLIP 软件包中 Neighbor 程序进行 UPGMA 聚类分析。分支图分析使用了 COMPONENT 软件^[6]。

2 研究结果

2.1 PCR-RAPD

20 个引物除第 4、6、9、14、17 号引物外都产生了丰富的扩增片段 (图 1、表 1), 平均每

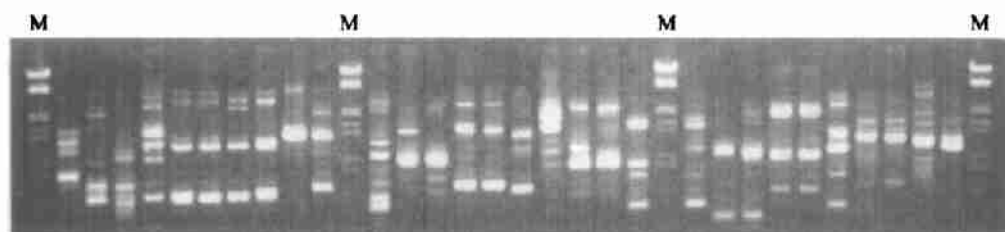


图1 随机引物OPV-10对鲤科鱼类的RAPD扩增结果

Fig.1 Electrophoretogram of amplification products of genomic DNA from cyprinid fishes amplified with primers OPV-10

个引物产生 6.2 条带。片段大小从 0.5Kb 到 2.0Kb。

表1 用于RAPD分析用的随机引物序列及扩增情况

Tab.1 RAPD primers and amplified result					
引物	5' -3' 序列	扩增带数	引物	5' -3' 序列	扩增带数
Primers	Sequences	Amplified Bands	Primers	Sequences	Amplified Bands
S1	GTTTCGCTCC	15	S11	GTAGACCCGT	13
S2	TGATCCCTGG	9	S12	CCTTGACGCA	8
S3	CATCCCCCTG	4	S13	TTCCCCCGCT	5
S4	GGACTGGAGT	—	S14	TCCGCTCTGG	—
S5	TGCGCCCTTC	13	S15	GGAGGGTGTT	6
S6	TGCTCTGCCC	—	S16	TTTGCCCGGA	5
S7	GGTGACGCAG	9	S17	AGGGAACGAG	—
S8	GTCCACACGG	13	S18	CCACAGCAGT	12
S9	TGGGGGACTC	—	S19	ACCCCCGAAG	4
S10	CTGCTGGGAC	12	S20	GGACCCTTAC	4

2.2 UPGMA 分析

用 RAPD PLOT 软件将 RAPD 所产生的条带矩阵转换成遗传距离矩阵($d = 1 - S$)。以 d 值, 用 Phylip 软件包中 NJ 程序 (UPGMA 方法) 计算出 30 个个体的聚类分支图 (图 2)。

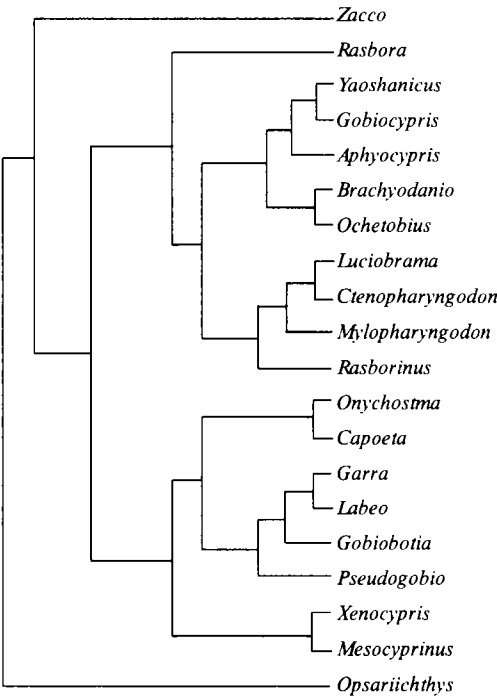


图2 基于RAPD分析的鲤科鱼类NJ分支系统图

Fig.2 NJ tree based on RAPD for cyprinid fishes

2.3 系统发育

根据分支图解 2, 可以看出: 1) 鲴亚科的所有属并未形成单系类群; 该类群中的马口鱼

类与鲤亚科、鲴亚科、野鲮亚科、鲃亚科、鳅鲇亚科和鲟亚科的代表种类形成单元群,该单元群然后才和鲟亚科的其余种类形成一对姊妹群,也就是说鲟亚科的 2 个类群各自形成一个单元群,但它们并未形成姊妹群,而是中间插入了鲤科中一些亚科的代表性种类。2) 雅罗鱼亚科也未形成单系类群。但是,当作者将图 2 所示系统分支图输入计算机程序 COMPONENT, 去掉图中雅罗鱼亚科和鲟亚科以外的属种,得到了一个新的分支系统图(图 3)。其结果显示: 鲟亚科和雅罗鱼亚科都独立形成单元类群。 鲟亚科鱼类由二个单元群组成, 马口鱼类与其余鲟亚科鱼类形成了一对姊妹群。这一对姊妹群在形态上有明显的标志, 马口鱼类的上下颌具有相吻合的凹凸结构, 而细鲫类没有这样的结构。而其余几种雅罗鱼则形成另一个单元群。

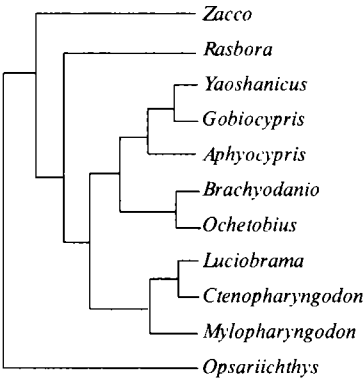


图3 低等鲤科鱼类的NJ分支图

Fig.3 NJ tree based on RAPD for primitive cyprinid fishes

3 讨论

从现有的化石资料证实在第三纪的始新世以前东亚地区就生活有鲤科鱼类;陈宜瑜^[7]通过化石的观察和鉴定认为它们大都属于原始的鲃类和鲟类,从而推论出这种以鲃亚科和鲟亚科鱼类为主体的鲤科鱼类区系,在老第三纪一直占有主要地位并可能一直延续到早上新世,上新世以后的一系列重大地质历史事件,包括以后的青藏高原的急剧隆升,都对原始鲤科鱼类的物种分化产生极大的影响。雅罗鱼亚科是鲤科的重要成分,其分布状态表明它具有较强的对寒冷环境的适应能力和较长的演化散布历史。从其特征来看,也表现出它是接近鲟亚科鱼类的一个原始的类群;据此推测,雅罗鱼亚科鱼类是在全球性气温变冷的早期就从原始的鲟亚科鱼类中派生出来适应寒温带的一个类群。所以,低等的鲤科鱼类包括鲟亚科和雅罗鱼亚科鱼类。

在基于形态学的鲤科鱼类系统中,鲟亚科是作为一个单元类群对待的。其中的马口鱼类是一个形态上非常相似的类群,因其具有共同离征而被作为一个单元类群。而另外的细鲫类并没有多大的理由放在一个单元群里。RAPD 分析并没有覆盖所有的低等鲤科鱼类,但所选种类均具有代表性。但作为外类群,作者将鲤科各亚科的代表性种类都包括其中。在所有外类群都存在的情况下,分支系统图显示鲟亚科的单系并不明显。在形态学系统中,鲟亚科鱼类,作为一个单元群,根据其口部的结构被分为马口鱼类和细鲫类。但

在 RAPD 分析结果中, 鲴亚科并未形成一个单元类群, 其中的马口鱼类和宽鳍鱲与鲤亚科、鲮亚科、野鲮亚科、鲃亚科、鳅鲃亚科和鲃亚科形成一个单元群。该单元群又与鲴亚科中的细鲫类的所有种形成姊妹群。细鲫类的 5 个属鲃属 (*Gobiocypris*), 瑶山鲤属 (*Yaoshanicus*), 细鲫属 (*Aphyocypris*), 斑马鱼属 (*Brachydanio*) 和波鱼属 (*Rasbora*) 形成了一个单系群。

但是当在上述分支系统图中去掉鲤亚科、鲮亚科、野鲮亚科、鲃亚科、鳅鲃亚科和鲃亚科的种类后, 其系统发育关系又趋于正常。鲴亚科中的两大类各自形成单元群, 但是它们分别与鲤科其余各亚科之间的关系从 RAPD 分析中就无从知晓了。RAPD 分析作为系统发育研究的工具有较多成功的例子^[8-10]。从此项研究中可以看出, RAPD 分析方法在鲤科的亚科之间使用是不合适的, 但作为亚科内各属之间的亲缘关系研究仍是一个经济、快捷的方法。

参 考 文 献

- [1] 陈湘舜等. 鲤科的科下类群及宗系发生关系 [J]. 动物分类学报, 1984, 9(4): 424—440
- [2] Halward T. et al. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1992, 18: 315—325
- [3] 何舜平、汪亚平、陈宜瑜, 1997 五种鲤科鱼类 RAPD 分析兼论鲃属的系统位置 [J]. 水生生物学报, 21(3): 262—267
- [4] Ausel F M. Short protocols in Molecular Biology (2nd Ed) [M]. London: John Wiley & Sons, 1992.
- [5] Willinames J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18(22): 6531—6535
- [6] Page R D M Component [M], the natural history museum, London, 1993
- [7] 陈宜瑜等. 珠江的鱼类区系及其动物地理区划的讨论 [J]. 水生生物学报, 1986, 10(2): 228—236
- [8] Demeke T, et al. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in Brassic [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 990—984
- [9] Kazan K, et al. Genetic relationships and variation in the *Sylonsanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 43—49
- [10] Williams C E, Clair A. St. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accession of *Lycopersicon esculentum* [J]. *Genome*, 1993, 36(3): 619—630

THE RAPD ANALYSIS AND THE PHYLOGENETIC CONCERNING FOR PRIMITIVE CYPRINIDAE

HE Shun-ping, WANG Wei and CHEN Yi-yu

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072*)

Abstract: Many informative fragments of the RAPD were obtained from 30 individuals that representing 20 species of the primitive cyprinid fishes by the method of random amplifying with 20 primers. We converted the DNA polymorphic fragment into genetic distance by the program Rapdplot ($d = 1 - S$, $S = 2N_xN_y / N_x + N_y$). The programs Neighbor in software package PHYLIP was used to calculated the matrix of genetic distance resulted which in one cladogram of 20 species. It is indicated that the application of the RAPD analysis for Cyprinidae may have some limitations. For the inter-genera analysis in same subfamily, the result is reliable. The result of the RAPD analysis indicates that: the subfamily Danioinae is not a monophyletic group. Among them, the *Zacco* group and *Aphyocypris* group form monophyly respectively. And in this subfamily, the two groups do not have a direct relationship.

Key words: Cyprinidae, Phylogenetics, Molecular evolution, RAPD analysis