

研究简报

# 中国 科鱼类 RAPD 分析及 鱼类单系性的初步研究

王 伟<sup>1</sup> 李默怡<sup>1,2</sup> 何舜平<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

## THE RAPD ANALYSIS AND THE PRELIMINARY OVERVIEW OF MONOPHYLETISM FOR CHINESE SISORIDAE

WANG Wei<sup>1</sup>, LI Mo-yi<sup>1,2</sup> and HE Shun-ping<sup>1</sup>

(1. Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. College of Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词: 科; 分子进化; RAPD 分析; 分子系统学

**Key words:** Sisoridae; Molecular evolution; RAPD analysis; Molecular systematics

中图分类号: Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0092-003

鱼类已被形态学证明是 科鱼类的一个自然类群, 包括原 属 (*Glyptosternum*)、石爬 属 (*Euchiloglanis*)、 属 (*Pareuchiloglanis*)、 属 (*Exostoma*) 等 9 属 31 个种, 它们与非 鱼类在生存环境和形态特征上存在明显差异<sup>[1]</sup>。已有研究表明, 鱼类的进化发展与青藏高原的几次隆升有关<sup>[2]</sup>。由于隆升作用, 青藏高原上不同地区的 鱼类被隔离开来独自进化, 这些独自进化的类群是否属于单系类群, 即是否来自同一祖先, 鱼类与非 鱼类的关系如何, 阐明这些问题将对研究青藏高原的形成有着重要启示。目前, 从形态学上研究该问题的已经比较深入, 但分子系统学方面的研究仍很少涉及。何舜平等<sup>[5-7]</sup>运用 RAPD 的方法对五种鲤科鱼类及低等鲤科鱼类进行的分析说明了 RAPD 分析与形态特征所得的结果也是相一致的。本文使用 40 个随机引物对 科鱼类 4 个属代表种类的 12 个体及其 4 个外类群进行了 PCR 扩增, 是有文献记载的首次使用 RAPD 技术对如此的高阶元的分类单元进行系统学研究。

### 1 材料和方法

所选 16 个个体均为 95% 乙醇浸泡保存的肌肉和肝脏组织, 其种类分别为: 科 属的巨 [ *Bagarius yarrelli* (Sykes) ]、纹胸 属的福建纹胸 [ *Glyptothorax fukiensis fukiensis* (Rendahl) ]、原 属的黑斑原

[ *Glyptosternum maculatum* (Regan) ]、石爬 属的青石爬 [ *Euchiloglanis davidi* (Sauvage) ] 及 4 外类群: 鲇 [ *Silurus asotus* Linnaeus ]、胡鲇 [ *Clavias fuscus* (Lacepede) ]、黄颡鱼 [ *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) ] 和长臀鲇 [ *Cranoglanis boudieri boudieri* (Richardson) ]。样品主要采自于云南、四川、福建、西藏等地区。

实验分为两阶段, 第一阶段用 12 个引物扩增代表科内四个属的 16 个样品, 以研究鱼类的 DNA 多态性; 第二阶段用四个外类群替换中的四个样品, 再用 28 个引物进行扩增, 在研究鱼类的单系性的同时也可研究 鱼类与非 鱼类之间的相互关系。DNA 提取采用常规方法, 除纹胸 DNA 取自肝脏外其余均来自肌肉。PCR-RAPD 反应应用何舜平等<sup>[3,5]</sup>的方法。所用引物为 Sangon 公司提供的第 L 组和第 O 组共 40 个引物, 引物序列见表 1。RAPD 反应结果由琼脂糖电泳检测, EB 染色, 紫外灯下照相记录。电泳所加 Marker 为  $\lambda$ EcoRI-HindIII, 片段大小为 0.5 kb-23 kb。电泳结束后计算机扫描记录下结果。所获得的多态性信息转换为 0,1 矩阵, 该矩阵通过 Rapdplot 程序计算出遗传距离, 然后经 NJ (Neighbour Joining) 生成系统发育分支图。

### 2 结果

#### 2.1 RAPD 引物序列及扩增结果

所用 40 个引物除第 17、40 号引物外都产生了大量的扩

收稿日期: 2001-09-12; 修订日期: 2002-03-20

基金项目: 国家自然科学基金重点基金课题(39830050)资助

作者简介: 王伟 (1975—), 男, 湖北省鄂州市人; 博士生; 主要从事鱼类系统进化及生物地理学方面的研究工作。李默怡同志现地址为华中科技大学生命科学学院

表 1 用于 RAPD 分析的随机引物序列及扩增情况  
Tab.1 RAPD primers and amplified result

引物 Primer	5'3' 序列 Sequences	扩增带数 Amplified bands	引物 Primer	5'3' 序列 Sequences	扩增带数 Amplified bands
S <sub>1</sub>	GGCATGACCT	11	S <sub>21</sub>	GGCACGTAAG	26
S <sub>2</sub>	TGGGCGTCAA	3	S <sub>22</sub>	ACGTAGCGTC	11
S <sub>3</sub>	CCAGCAGCTT	8	S <sub>23</sub>	CTGTTGCTAC	22
S <sub>4</sub>	GACTGCACAC	12	S <sub>24</sub>	AAGTCGCTC	14
S <sub>5</sub>	ACGCAGGCAC	9	S <sub>25</sub>	CCCAGTCACT	7
S <sub>6</sub>	GAGGGAAGAG	12	S <sub>26</sub>	CCACGGGAAG	10
S <sub>7</sub>	AGGCGGGAAC	5	S <sub>27</sub>	CAGCACTGAC	6
S <sub>8</sub>	AGCAGGTGGA	16	S <sub>28</sub>	CCTCCAGTGT	7
S <sub>9</sub>	TGCGAGAGTC	5	S <sub>29</sub>	TCCCACGCAA	14
S <sub>10</sub>	TGGGAGATGG	12	S <sub>30</sub>	TCAGAGCGCC	12
S <sub>11</sub>	ACGATGAGCC	12	S <sub>31</sub>	GACAGGAGGT	4
S <sub>12</sub>	GGGCGGTACT	3	S <sub>32</sub>	CAGTGCTGTG	6
S <sub>13</sub>	ACCGCCTGCT	19	S <sub>33</sub>	GTCAGAGTCC	12
S <sub>14</sub>	GTGACAGGCT	16	S <sub>34</sub>	AGCATGGCTC	6
S <sub>15</sub>	AAGAGAGGGG	21	S <sub>35</sub>	TGGCGTCCTT	15
S <sub>16</sub>	AGGITGCAGG	6	S <sub>36</sub>	TCGGCGGTTC	9
S <sub>17</sub>	AGCCTGAGCC	—	S <sub>37</sub>	GGCITTATGCC	8
S <sub>18</sub>	ACCACCCACC	18	S <sub>38</sub>	CTCGCTATCC	31
S <sub>19</sub>	GAGTGGTGAC	12	S <sub>39</sub>	GGTGCACGTT	10
S <sub>20</sub>	TGGTGGACCA	9	S <sub>40</sub>	ACACACGCTG	—

增片段(表 1), 平均每个引物产生 11.25 个条带, 片段大小从 0.5kb~2kb。

2.2 UPGMA 分析

用 RAPD PLOT 软件将 RAPD 所产生的条带矩阵转换为遗传矩阵 $[D=1-S(\text{similarity}), S=2N_{xy}/(N_x+N_y), N_{xy}$ —两者共有的条带 $N_x+N_y$ —两者总共的条带]。再以值用 PHYLIP 软件包中的 NEIGHBOR 程序生成 16 个个体的聚类分支图(图 1, 图 2)。

3 讨论

3.1 种内遗传多样性

使用不同的引物先后对青石爬 12 个个体进行 RAPD 分析, 发现其种内遗传变异并不大, 而且所有的青石爬个体都聚在一起形成一个单元群(图 1)。根据遗传距离矩阵可以看出: 在第一阶段和第二阶段实验中, 石爬的种内遗传距离分别在 0.1181—0.6296 \ 0.0556—0.2880 之间, 种内遗传比较稳定。从两个聚类分支图来看, 石爬个体之间的亲缘关系却发生了一些改变, 尤其是 9、11 号样品的位置变化很大。但两张图中也有许多相符的地方, 如第 12 号样品始终是变异最大与其他样品亲缘关系最远的, 两张图都显示

5、6、7 号样品亲缘关系比较近, 8、10 号样品之间的亲缘关系也比较近。

3.2 鱼类与非 鱼类系统发育的比较

从两个分支系统图可以看出: 石爬属与原属虽然在形态上都归属于 鱼类, 但它们在 属, 纹胸属存在的情况下不能形成一个单系类群即它们不起源于同一个祖先。图 2 是以四个外类群为参照的聚类分支图, 从中可看出原属与纹胸属可划分为一个单元群, 原属是一个特化类群而纹胸属是一个广布类群。属与以上任何三属都不能划分为一个单元群, 它也是 4 个属中进化上最原始的一个类群。图 2 以非 鱼类的 属作为外类群, 所得结果与图 1 相符。

3.3 形态学研究结果的比较

形态学研究认为 鱼类是一个单系类群, 其中原属是一个最原始的类群, 并且推测 鱼类的类纹胸祖先随青藏高原的隆升进化顺序依次为: 类纹胸祖先→原属→石爬属→ 鱼类其他属。但通过在分子系统学方面的初步研究发现, 本实验中代表 鱼类的两个属来自两个不同的祖先, 而且不是原始类群却是一个特化类群, 它还可以和非 鱼类的纹胸属划为一个单元群。至于 鱼类

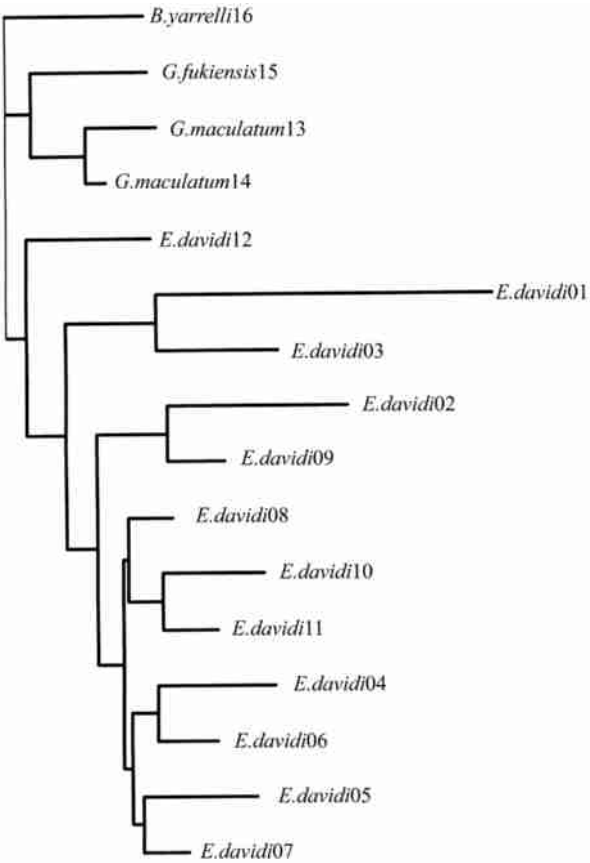


图 1 基于 PCR-RAPD 多态遗传距离的 NJ 聚类图显示石爬 种间相互关系

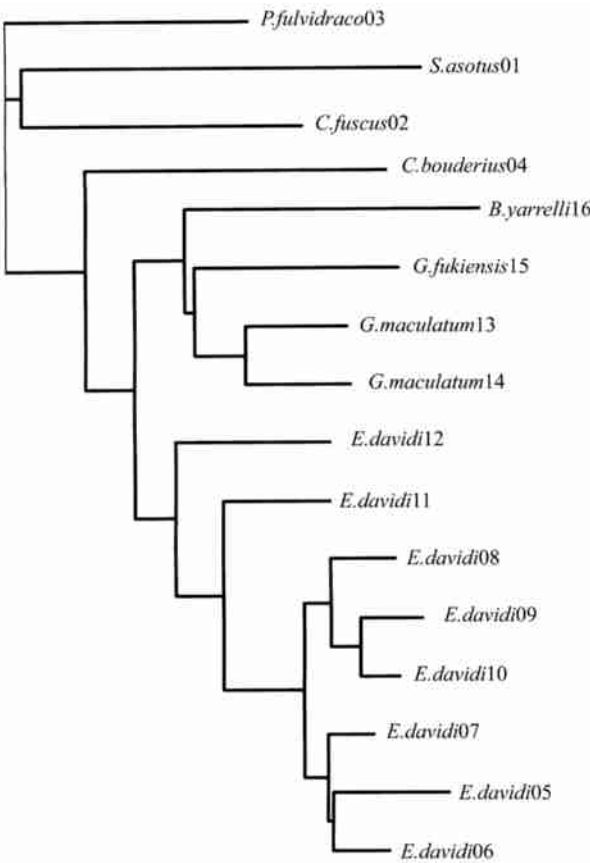


图 2 基于 PCR-RAPD 多态遗传距离的 NJ 聚类图 2 示 鱼类种间的关系

Fig. 1 Neighbor joining tree based on PCR-RAPD genetic distance showing the relationships among species of Eucilichthys

Fig. 2 Neighbor joining tree based on PCR-RAPD genetic distance showing the relationships among species of Glyptosternoid fishes

中的其他属与这两个属之间的关系还需要进一步研究。形态学研究认为 鱼类各属间的关系比 鱼类与非鱼类之间的关系要远,但这次 RAPD 分析的结果与此相左。此次研究也说明在系统发育的研究中进行形态学与分子系统学两方面结果的对照比较很有必要。

参考文献:

[ 1 ] He S. The phylogeny of the Glyptosternoid fishes (Teleostei: Siluriformes, Sisoridae)[J]. *Cybiu*, 1996, **20**(2): 115—159  
[ 2 ] He S. The analysis of historical biogeography for the Glyptosternoid fishes (Teleostei: Siluriformes, Sisoridae)[J]. *Biogeographica*, 1995, **71**(4): 145—160  
[ 3 ] He S P, Wang Y P, Chen Y Y. The RAPD analysis for five cyprinid

fishes with notes to the systematic position of *Gobiocypris rarus*[J]. *Acta Hydrobiol. sinica*, 1997, **21**(3): 262—267. [何舜平、汪亚平、陈宜瑜. 五种鲤科鱼类 RAPD 分析兼论鮡鲫的系统位置[J]. 水生生物学报, 1997, **21**(3): 262—267]  
[ 4 ] He S P, Wang W, Chen Y Y. the RAPD analysis and the phylogenetic Concerning for primitive Cyprinidae[J]. *Acta Hydrobiol. sinica*, 2000, **24**(3): 101—106. [何舜平、王伟、陈宜瑜. 低等鲤科鱼类 RAPD 分析及系统发育研究[J]. 水生生物学报, 2000, **24**(3): 101—106]  
[ 5 ] Wang W, He S P, Nakajima T. The RAPD analysis for cyprinid fish (*Aphyocypris* and *Hemigrammocypripis*) [J]. *Acta Hydrobiol. sinica*, 2001, **25**(4): 358—361. [王伟、何舜平、中岛经夫. 日本产和中国产中华细鲫的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 358—361]