

五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论 稀有鮡鲫的系统位置¹⁾

何舜平 汪亚平 陈宜瑜

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

提 要

本文作者采用 20 个随机引物,对五种鲤科鱼类,即稀有鮡鲫、中华细鲫、麦穗鱼、唐鱼和草鱼的基因组进行了 DNA 随机扩增分析(Random Amplified Polymorphic DNA,即 RAPD)。其目的是为了探讨稀有鮡鲫的系统分类位置。研究结果表明在所研究的物种中,稀有鮡鲫与中华细鲫和唐鱼有更近的亲缘关系。

关键词 RAPD, 系统位置, 分类学, 鲤科

稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus* Fu et Ye)是一种小形鲤科鱼类,近年来被作为实验材料鱼越来越多地用在生态、遗传、生理和水污染等研究领域,是一种很有前途的标准实验动物。但作为鲤科的一属,其分类学地位较为模糊,它的外部形态与鲴亚科、鮡亚科都存在着一定的相似性。与北美广布的小型鲤科鱼类 *Notropis* 和 *Pimephales* 在形态上也极为相似。在骨骼形态方面很难找到与鮡亚科和鲴亚科的离征。由于形态学方法在稀有鮡鲫系统位置研究上遇到较大的困难,故用分子生物学的方法对其系统位置进行研究具有重要的意义。

RAPD 技术即随机扩增的多态性 DNA 技术,是建立在 PCR 技术基础上的一种检测基因组 DNA 多态性的方法。其基本原理是 PCR 聚合酶链式反应,引物是单个随机的寡核苷酸单链。如果基因组在被 PCR 扩增区域曾发生过 DNA 片段的插入、缺失或碱基对的突变,就可能导致这些特定结合位点的分布,发生相应的变化或者扩增区段长度发生变化,从而使 PCR 产物增加、缺少或发生分子量的改变。这种 DNA 的多态性可作为系统发育的表征。Halward 等^[1]用 10 个引物对花生的 29 个野生种基因组分别进行 RAPD 检测,然后根据扩增图谱中条带的统计数据,运用 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony)程序建立了它们的亲缘关系图,其结果与形态方法得到的结果基本一致。

作者使用 20 个随机引物对稀有鮡鲫等五种鲤科鱼类的基因组进行 RAPD 扩增。扩增的结果使用聚类和简约的方法进行分析,以确定稀有鮡鲫的系统位置。

1) 淡水生态和生物技术国家重点实验室课题。本工作得到国家自然科学基金 39500016 和 49272076 的资助。

1996 年 4 月 9 日收到。

1 材料与方法

用于 RAPD 分析的 5 种鱼的新鲜标本主要由中国科学院水生生物研究所鱼类学研究室生态组提供, 包括鲴亚科的稀有 鮡鲫 (*Gobiocypris rarus* Fu et Ye), 中华细鲫 (*Aphyocypris chinensis* Gunther), 唐鱼 (*Tanichthys alborubes* Lin); 雅罗鱼亚科的草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes); 鮡亚科的麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva* Temminck et Schlegel)。

基因组 DNA 的分离用 Ausubel 等^[2]的方法; 材料取自新鲜鱼背鳍前的肌肉; 每个种取 10 个样品, 第一和第二个样品单独处理, 另外 8 个样品混合处理, 目的是为了检测种内个体的差异。RADP 扩增反应用 Williams 等^[3]的方法, 所用引物为 OPERON 公司产第 V 组共 20 个引物 (V-01 至 V-20), 最适反应混合液组分为: H₂O, 16.5μl; 10 × 反应缓冲液, 2.5μl; 25 mM MgCl₂, 2.5μl; 10 mM dNTPs, 1.25μl; 随机引物 1μl; 模板 DNA, 1.5μl; TaqDNA 聚合酶, 0.25μl。引物序列见表 1; 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后置于紫外透射检测仪观察照相记录。数据处理包括: 统计出引物在不同物种中扩增的相同条带数及各个种的总条带数; 计算各种间的遗传距离; 辨别结果的祖离征意义, 归纳出特征矩阵。CLADISTICS 分析: HENNIC-86 软件生成分支图。

2 结果和分析

2.1 RAPD 的扩增结果 所使用的 20 个引物中有 15 个有显而易见的扩增产物, 其中 V6, V14 和 V16 所扩增的条带不甚清晰, 本文未加采用 (表 1)。V04, V05, V09, V11 和 V13 等 5 个引物没有扩增产物。最后选取 12 个引物的扩增结果 (表 2)。

表 1 20 个引物的 DNA 序列及其扩增效果
Tab.1 Sequences and amplified efficiency with 20 primers

引 物 Primer	序 列 Sequences	扩增效果 Amplified efficiency	引 物 Primer	序 列 Sequences	扩增效果 Amplified efficiency
V-01	TGACGCATGG	++	V-11	CTCGACAGAG	--
V-02	AGTCACTCCC	++	V-12	ACCCCCCACT	++
V-03	CTCCCTGCAA	++	V-13	ACCCCTTGAA	--
V-04	CCCCTCACGA	--	V-14	AGATCCCGCC	+
V-05	TCCGAGAGGG	--	V-15	CAGTGCCGGT	++
V-06	ACGCCCAGGT	+	V-16 [√]	ACACCCACA	+
V-07	GAAGCCAGCC	++	V-17	ACCGGCTTGT	++
V-08	GGACGGCGTT	++	V-18	TGGTGGCGTT	++
V-09	TGTACCCGTC	--	V-19	GGGTGTGCAG	++
V-10	GGACCTGCTG	++	V-20	CAGCATGGTC	++

++, 扩增条带多而清晰, Excellent amplification, with many distinct and intense band
+, 扩增条少但清晰, Good amplification, with few distinct bands
--, 没有清晰的扩增条带, No amplification or with diffuse bands

2.2 五个种的相似率及遗产距离 扩增条带在种内差异很小, 每种三个样品在相同引物下大多数条带基本一致。5 个物种间共有条带数及各个种的条带总数见表 2。各种间的

表 2 部分引物对5种鲤科鱼类RAPD扩增的条带数及各种的条带总数

Tab.2 The Bands of RAPD with 12 primers for the 5 species of cyprinid fishes

种 species	总条带数 total bands	各引物的扩增条带数 bands by each primer											
		V01	V02	V03	V07	V08	V10	V12	V15	V17	V18	V19	V20
TAN*	49	2	3	2	5	5	2	5	4	6	6	4	5
GOB	49	3	3	4	5	4	3	4	7	2	6	4	4
APH	39	2	4	4	4	4	3	3	3	2	4	3	3
PSE	54	9	3	3	3	5	1	5	3	6	6	5	5
CTE	49	5	2	4	6	4	3	2	5	5	5	3	5

*TAN=唐鱼, GOB=稀有鮡鲫, APH=中华细鲫, PSE=麦穗鱼, CTE=草鱼。
*TAN for *Tanichthys albonube*, GOB for *Gobiocypris rarus*, APH for *Aphyocypris chinensis*, PSE for *Pseudorasbora parva*, CTE for *Ctenopharyngodon idellus*.

表 3 5种鲤科鱼类RAPD扩增产中共有的条带数目及相似率

Tab.3 The common bands and bands' similarities of RAPD among 5 cyprinid fishes

Species 种类	Same bands 相 同 条 带 数				Similarity rate (M%) 相 似 率 (M%)*			
	GOB	APH	PSE	CTE	GOB	APH	PSE	CTE
TAN	49	19	13	22	20	53.5	51.75	50.00
GOB	49	—	19	24	18	—	57.89	54.38
APH	39	—	20	15	—	—	55.26	45.61
PSE	54	—	—	28	—	—	—	55.26
CTE	49	—	—	—	—	—	—	—

* M=Nab/Nt. M=相似率, Nab=共有/共无的条带, Nt=总条带数。
* M=Nab/Nt. M for similarity; Nab for common all/none bands; Nt for total bands.

表 4 5种鲤科鱼类间的遗传距(d=1-M)

Tab.4 Genetic distances among 5 species of cyprinid fishes (d=1-M)

	GOB	APH	PSE	CTE
TAN	0.465	0.484	0.500	0.564
GOB	—	0.421*	0.456	0.588
APH		—	0.447	0.543
PSE			—	0.447
CTE				—

表 5 以1-M值用UPGMA法作聚类分析(1)

Tab.5 Cluster analysis using method of UPGMA by value 1-M (1)

	GOB-APH	TAN	PSE	CTE
GOB-APH	—	0.474	0.451	0.565
TAN		—	0.500	0.564
PSE			—	0.447*
CTE				—

相似率(M%)见表 3。五个种间的遗传距离 $d = 1 - M$ (表 4)。
2.3 UPGMA(Unweighted pair group method using arithmetic averages)分析结果 以 1-M 值用 UPGMA 方法作 5 个物种的聚类分析,令 $d = 1 - M$,算出 5 个物种两两之间的 d 值(表 4)。其中 * 为表中最小值,对应的 GOB 和 APH 聚类成对。以公式 $d_{ab}, c = (d_a, c + d_b, c) / 2$ 计算出 GOB-APH 分别与 TAN, PSE 和 CTE 的 d 值(表 5)。表中 * 为最小值,对应的 PSE-CTE 聚类成对。再以同样公式计算出 GOB-APH, PSE-CTE 和 TAN 相互之间

表6 1-M值用UPGMA法作聚类分析(2)
Tab.6 Cluster analysis using method of UPGMA
by value 1-M (2)

	PSE-CTE	GOB-APH	TAN
PSE-CTE	—	0.508	0.532
GOB-APH		—	0.474*
TAN			—

表7 以1-M值用UPGMA法作聚类分析(3)
Tab.7 Cluster analysis using method of UPGMA
by value 1-M (3)

	GOB-APH-TAN	PSE-CTE
GOB-APH-TAN	—	0.52
PSE-CTE		—

的 d 值(表 6)。表中 * 为最小值, GOB-APH 和 TAN 聚类成对。最后计算出 GOB-APH-TAN 与 CTE-PSE 之间的 d 值(表 7)。根据以上聚类分析得出分支图解(图 1)。

2.4 检约分析结果 以某一扩增条带的存在作为离征, 不存在作为祖征, 列出 5 种鲤科鱼类的特征矩阵(表 8), 该矩阵由 HENNIG86 软件以简约的方法(option: ie)生成成分支系统图(图 2)。结果显示, 在所研究的类群中, 稀有𩚰鲫、中华细鲫和唐鱼, 麦穗鱼和草鱼有较近的亲缘关系。同样的矩阵用 PHYLIP 软件包中的 RESTML 程序计算, 所得结果见图 3。

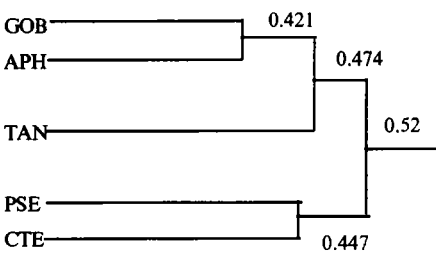


图1 基于 RAPD 分析结果的聚类分析图
Fig.1 Cluster dendrogram from the result of RAPD

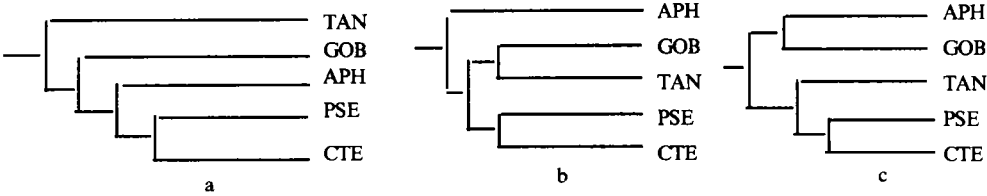


图2 基于 RAPD 分析结果的 3 个简约分支系统图(Hennig86, option: ie=枚举)
Fig.2 3 Parsimonous cladogram from result of RAPD (by the software Hennig86, option=ie)

表8 5种鲤科鱼类RAPD条带的“0、1”特征(0和1分别表示在相对位置没有或有条带)
Tab.8 Data matrix of RAPD analysis for 5 species of cyprinid fishes (0=band absent, 1=band exist)

TAN	0000000100	1001100001	0001000100	0001010011	1010101010	1101010011
GOB	0010010100	0000001100	1010101010	0001110100	0101100101	0011010001
APH	0000000000	1011110010	0001010011	0000100110	0001111000	0001011101
PSE	1111111001	0100100010	0101101000	0001111000	0001110110	0000010011
CTE	1001101110	0000100001	0000100100	1111111010	1110010100	0000111010
TAN	1110000101	1100111100	1100101011	1110010110	0100000110	1000
GOB	1110001011	1111000010	0100011101	0011001010	1010010100	1100
APH	0100001010	1000000010	0101000001	0010101000	1000011001	0000
PSE	1011010010	1000011111	0101101001	0010010100	1011011101	1000
CTE	1000111010	1000101101	0111011000	1001100001	0000111101	0011

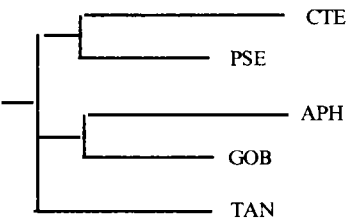


图3 基于RAPD分析结果的RESTML分支系统图(PHYLIP: RESTML, unrooted tree)
Fig.3 Cladogram of RESTML from result of RAPD (PHYLIP: RESTML, unrooted tree)

3 讨论

陈湘 彝等^[4]通过骨骼形态比较,运用分支系统学的理论和方法对鲤科的科下分类进行了研究,研究结果认为鲤科鱼类可分为雅罗鱼系和鲃系两个较大的分支,前者包括担尼鱼族和雅罗鱼族而后者包括丁鲷族和鲃族(图4)。雅罗鱼系和鲃系的主要区别在(1)复合神经骨(neural complex)上部分叉与否;(2)副蝶骨背部与眶间隔的关系;(3)舌动脉弓与鳃上动脉相连与否。从以上特征看稀有 鲃应属于雅罗鱼系。

雅罗鱼系下族的划分主要依据(1)围眶骨系的发达程度和(2)三叉颜面神经孔的位置。担尼鱼族的围眶骨系发达,上眶骨大,且与最后一块下眶骨相接触;下眶骨系的骨片覆盖整个肌肉束,泪骨不大于其他骨片。雅罗鱼族的围眶骨系骨片小,不覆盖眶下肌肉束;上眶骨与第五眶下骨脱离接触或相距甚远。担尼鱼族的三叉颜面神经孔前、后孔均位于前耳骨内;而雅罗鱼族的三叉颜面神经孔前孔却位于前耳骨与蝶耳骨的交界处。

稀有 鲃的围眶骨系较为特殊,泪骨明显大于其余四块眶下骨,围眶骨系骨片小,不覆盖住眶下肌肉束,该特征应属于雅罗鱼族;但稀有 鲃的三叉颜面神经孔均在前耳骨内,该特征属于担尼鱼系;而且在第五眶后,存在一长条形的膜化翼蝶骨(dermosphenotic),该结构在分布于北美的雅罗鱼 *Notropis* 和 *Pimephales* 中较为普遍^[5-6]。在我们所研究的产于中国的标本中未见此结构,国内也未见报道。而原认为与稀有 鲃相近的中华细 鲃、瑶山鲤、拟细 鲃却只有4块眶下骨,唐鱼则只有3块;稀有 鲃的第二和第三脊椎是愈合的,但中华细 鲃、瑶山鲤、拟细 鲃的是分离的。从外部形态特征看,稀有 鲃与担尼鱼族的 鲃亚科、雅罗鱼族的雅罗鱼亚科和 鲃亚科较为相似。外形上,稀有 鲃与中华细 鲃最为相似,但骨骼特征上却有较大的差别。从以上特征看,稀有 鲃的系统位置是很难确定的。造成这种结果的原因是我们缺乏鲤科鱼类的较完整的亚科级的系统发育研究结果。

RAPD被较多的作者用来进行不同分类单元的遗传距离、系统分类和系统发育研究^[7-12]。从RAPD研究结果的UPGMA聚类分析可以看出,稀有 鲃与中华细 鲃首先聚在一起(0.421),而后草鱼与麦穗鱼聚在一起(0.447),然后稀有 鲃和中华细 鲃与唐鱼聚在一起(0.474);最后草鱼+麦穗鱼才和稀有 鲃+中华细 鲃+唐鱼相聚(0.52)。该分析结果与陈湘 彝^[4](1984)鲤科宗系发生基本一致(图4),从而可以认为稀有 鲃与唐鱼、中华细 鲃等 鲃亚科鱼类有更近的亲缘关系。简约的方法与UPGMA方法的计算结果基本一致。

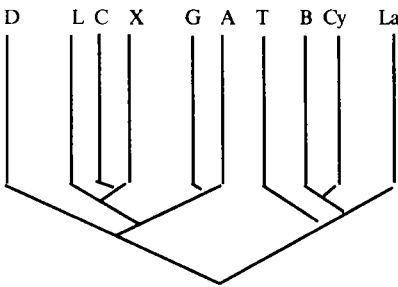


图4 鲤科宗系发生关系图(依陈湘 彝^[4],1984)
Fig.4 Cladogram illustrating the phylogenetic relationships in subfamilies of Cyprinidae (after Chen, 1984) D=Danioninae, L=Leuciscinae, C=Cultrinae, X=Xenocyprinae, G=Gobioninae, A=Acheilognathinae, T=Tincinae, B=Barbinae, Cy=Cyprininae, La=Labeoninae.

参 考 文 献

- [1] Halward T. et al. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol. Biol.*, 1992, **18**: 315—325.
- [2] Ausuel F. M. Short Protocols in Molecular Biology (Second Edition). 1992, John Wiley & Sons.
- [3] Williams J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**(22): 6531—6535.
- [4] 陈湘典等. 鲤科的科下类群及其宗系发生关系. 动物分类学报, 1984, **9**(4): 424—440.
- [5] Gosline A. W. The Cyprinid Dermosphenotic and the Subfamily Rasborinae. Occasional Papers of the Museum of Zoology, Univ. Michigan, 1975, No.673.
- [6] Harrington, Jr. R. W., 1955 The Osteocranium of the American Cyprinid fish, *Notropis bifrenatus*, with an Annotated Synonymy of Teleost Skull Bone. *Copeia*, 1955(4): 267—290.
- [7] 裴颜龙等. 矮牡丹与紫牡丹 RAPD 分析初报. 植物分类学报, 1995, **33**(4): 350—356.
- [8] Aruna, N. et al. Genetic relatedness among rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) cultivars determined by DNA amplification using single primers of arbitrary seauence. *Genet*, 1992, **36**(5): 971—977.
- [9] Demeke, T et al. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in Brassica. *Theor Appl Genet*, 1992, **84**: 990—984.
- [10] Kazan, K. et al. Genetic relationships and variation in the *Stylonsanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphie DNA. *Genome*, 1993, **36**(1): 43—49.
- [11] Yang, X, Quiros, C. Identification and classication of Celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1993.
- [12] Williames 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 accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 1993, **36**(3): 619—630.

THE RAPD ANALYSIS FOR FIVE CYPRINID FISHES WITH NOTES TO THE SYSTEMATIC POSITION OF *Gobiocypris rarus*

He Shunping, Wang Yaping and Chen Yiyu

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academe of Sciences, Wuhan, 430072)

Abstract

Five species of cyprinid fishes, *Gobiocypris rarus*, *Aphyocypris chinensis*, *Tanichthys albonubes*, *Ctenopharyngodon idellus* and *Pseudorasbora parva* are analysed using 20 random primers by the method of RAPD. The destination of the analysis is to decide the systematic position of *Gobiocypris rarus*. The result indicates that in the studied species, *Gobiocypris rarus* have the nearest relationship with *Aphyocypris chinensis*, and then with *Tanichthys albonubse*.

Key words RAPD, Systematic position, Taxonomy, Cyprinidae