日本产和中国产中华细鲫的 RAPD 分析

王　伟[1]　何舜平[1]　中岛经夫[2]
(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉　430072; 2. 滋贺县立琵琶湖博物馆, 日本　525-001)

摘要: 使用 20 个随机引物对日本和中国辽宁产中华细鲫、日本产 *Hemigrammocypris* sp. 和中国产稀有　鲫各 4 个个体的随机扩增, 得到了大量 DAN 多态片段。通过 Rapdplot 程序将 DAN 的多态片段转换成遗传距离(d= 1- S, S= 2NxNy/Nx+ Ny)。该遗传距离的矩阵经 Phylip 软件包中 Neighbor 程序计算, 生成了四个物种的相互关系分支图。从图中可以看出, 分布于日本和中华细鲫有较近的遗传距离, 然后是 *Hemigrammocypris*, 最后是稀有　鲫。该结果说明分布于日本和中国的中华细鲫是同一个物种。日本的 *Hemigrammocypris* 是一个独立的物种。

关键词: 鲤科鱼类; 亲缘关系; RAPD
中图分类号: S965.117　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3207(2001)04-0358-04

中华细鲫(*Aphyocypris chinensis* Günther) 是广布于中国江河平原区的小型鲤科鱼类, 主要生活在小水体中。该种也分布于日本相似的生境。同时在日本分布的有相近种 *Hemigrammocypris* sp.。两个物种在形态上容易混淆。在中国还有相近种稀有　鲫(*Gobiocypris rarus* Yu et Fu)。从外部形态上区别这些物种有一定的困难。为了研究这些物种的有效性及相互关系, 将使用随机引物扩增的 DNA 多态分析四个物种之间的亲缘关系。

RAPD 即随机扩增多态性 DNA, 是利用一组单个的, 序列随机的寡核苷酸单链为引物, 采用较低的退火温度, 对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增[1]。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, 就可导致这些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, 因而使 PCR 的产物增加、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。一般认为 RAPD 分析方法适用于亲缘关系较近物种的研究。Halward 等[2]用 10 个引物对 29 个花生野生种基因组, 何舜平等[3,4]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也说明了 RAPD 分析与形态特征所得的结果也是相一致的。众多的研究结果也说明 RAPD 分析对研究有较近亲缘关系的物种是有效的。

收稿日期: 1999-11-20; 修改日期: 2001-03-12
基金项目: 国家自然科学基金课题(批准号: 39500016)
作者简介: 王伟(1975—), 男, 湖北省鄂州人; 硕士生; 主要从事鱼类系统进化及生物地理学方面的研究

1　材料与方法

1.1　材料　用于 RAPD 分析的 12 个个体分别代表 4 种鲤科鱼类(每种 4 个个体) , 标本采自辽宁、四川、日本。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: 分别来自于日本和中国的中华细鲫, 日本的和中国的稀有　鲫。

1.2　方法　样本固定、总 DNA 提取用 Ausubel[5] 的方法; 材料取自酒精固定标本的肌肉。PCR- RPAD 反应用 Williams 等[1]的方法。所用引物为 Operon 公司产的第 S 组共 20 个随机引物。最适反应组分为: H_2O, 10x 反应缓冲液; $MgCl_2$; dNTP; 随机引物; 模板 DNA; TaqDNA 聚合酶, 引物序列见表 1; 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 数字由 RAPDPLOT (Black) 转换成遗传距离(d= 1- S, S= 2NxNy/ Nx+ Ny) , 然后用 PHYLIP 软件包中 Neighbor 程序进行 UPGMA 聚类分析。

2　结果与讨论

2.1　PCR- RAPD

18 个引物都产生了丰富的扩增片段(表 1) 。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
S1	GTTTCGCTCC	22	S10	CTGCTGGGAC	20
S2	TGATCCCTGG	8	S11	GTAGACCCGT	8
S3	CATCCCCCTG	21	S12	CCTTGACGCA	8
S4	GGACTGGAGT	19	S13	TTCCCCCGCT	7
S5	TGCGCCCTTC	24	S14	TCCGCTCTGG	7
S6	TGCTCTGCCC	20	S15	GGAGGGTGTT	12
S7	GGTGACGCAG	14	S16	TTTGCCCGGA	12
S8	GTCCACACGG	12	S17	AGGGAACGAG	13
S9	TGGGGACTC	—	S18	CCACAGCAGT	7

表 **2**　各种间相同的条带数和遗传距离

Tab. 2　the number of the shared bands between species and their genetic distance

	HEM	APH	GOB		HEM	APH	GOB
APH	27	34	25	APH	0. 54	0. 39	0. 57
HEM		27	23	HEM		0. 52	0. 63
APH			22	APH			0. 63

2.2　UPGMA 分析

用 RAPDPLOT 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 程序中 UPGMA 计算出 4 个种 12 个个体的聚类分支图(图 1) 。

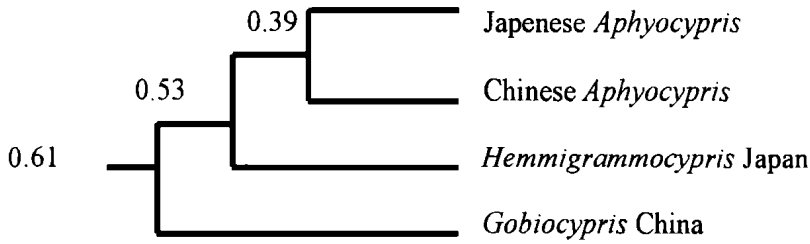


图 1 *Aphyocypris*, *Hemmigrammocypris* 等 4 个种的分支系统图

Fig. 1 NJ tree based on RAPD for the four species

2.3 系统发育

根据分支图解 1, 可以得到以下的系统发育假说:

1) 中国产的中华细鲫与日本产的中华细鲫是一个物种;

2) *Hemigrammocypris* 是一个独立的物种, 与中华细鲫有较近的关系;

3) 稀有 鲫与中华细鲫的关系较远。

所研究的 4 个鱼类均属于 亚科, 该类群又被 Gosline[6] 称作波鱼亚科(Rasborinae) , 是从雅罗鱼亚科中划分出来的一个类群, 在形态上以具有发达的围眶骨系, 上眶骨与第五下眶骨相接等鲤科鱼类的原始特征与其它亚科相区分。但到目前为止, 我们还未发现它作为一个单元群所必须具有的共同特征, 因此这个亚科只是若干原始鲤科鱼类类群的集合, 难以寻求演化历史和与派生类群间的关系。

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 类和 类, 从而推论出这种以 亚科和 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。中华细鲫在日本和中国大陆的共同分布说明了日本和大陆在地史上有较强的联系。

参考文献:

[1] Williams J G K, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**(22): 6531—6535

[2] Halward T. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Plant Nol. Biol.*, 1992, **18**: 315—325

[3] 何舜平, 汪亚平, 陈宜瑜. 五种鲤科鱼类 RAPD 分析兼论 鲫的系统位置[J]. 水生生物学报, 1997, **21**(3): 262—267

[4] 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**(2): 101—106

[5] Auseul F M. Short protocols in Molecular Biology (2^{nd} Ed) [M]. London: John Wiley & Sons. 1992

[6] Goslin W A. 1975, The cyprinid dermosphenotic and the subfamily Rasborinae [J]. *Occ pap. Mus. Zool. Univ. Mich.* **673**: 1—13

[7] 陈宜瑜. 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

THE RAPD ANALYSIS FOR CYPRINID FISH (*APHYOCYPRIS* AND *HEMIGRAMMOCYPRIS*)

WANG Wei[1], HE Shun-ping[1] and NAKAJIMA Tseno[2]

(1. *Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072;
2. *Lake Biwa Museum, Shiga,* 525-001, *Japan*)

Abstract: Many informative fragment of RAPD were obtained from *Aphyocypris chinensis* (Japan and China), *Hemigrammocypris* sp. (Japan), *Gobiocypris rarus* (China) by the method of random amplifing with 20 primers. We convert the DNA polymorphis fragment into genetic distance by the program Rapdplot (d= 1- S, S= 2NxNy/Nx+ Ny). The matrix of genetic distance was cacurlated by the program Neighbor in software package Phylip, resulting in one cladogram of four species. This result indicated that the species *Hemigrammocypris* sp. is an independent one and the species *Aphyocypris* in China and Japan is the same species.

Key words; Cyprinidae; Phylogeny; RAPD

中国科学技术信息研究所统计

1999 年按被引频次和影响因子排序的前 20 名生物学类期刊

名次	期刊名称	被引频次	名次	期刊名称	影响因子
1	植物学报	1639	1	植物学报	0.809
2	植物生理学通讯	1132	2	遗传学报	0.723
3	植物生理学报	741	3	植物生态学报	0.620
4	生物化学与生物物理进展	646	4	植物生理学报	0.604
5	遗传学报	644	5	实验生物学报	0.556
6	植物生态学报	615	6	生物化学与生物物理学报	0.464
7	生物化学与生物物理学报	461	7	生物工程学报	0.452
8	昆虫学报	447	8	人类学学报	0.446
9	动物学报	413	9	生物多样性	0.415
10	植物分类学报	409	**10**	水生生物学报	**0.391**
11	微生物学报	401	11	微生物学报	0.381
12	云南植物研究	400	12	生物物理学报	0.380
13	中国生物化学与分子生物学报	385	13	动物学报	0.377
14	水生生物学报	**378**	14	中国生物化学与分子生物学报	0.372
15	生理学报	355	15	植物生理学通讯	0.365
16	生物工程学报	345	16	云南植物研究	0.363
17	遗传	323	17	生理学报	0.360
18	微生物学通报	300	18	细胞生物学杂志	0.344
19	动物学研究	299	19	植物分类学报	0.313
20	昆虫知识	295	20	动物学研究	0.311

——摘自《1999 年度中国科技期刊引证报告》