

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0469 - 06

用 RAPD 技术探讨 5 种鲷科鱼类的亲缘关系

杨慧荣^{1,2}, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;
2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 用 RAPD 技术对鲷科鱼类的黑鲷、真鲷、二长棘鲷、平鲷和黄鳍鲷进行亲缘关系的研究。在事先优化的反应条件下, 在使用的 60 个随机引物中, 有 29 个引物扩增出清晰稳定的片段, 共计 200 条, 大小在 200 ~ 2500 bp 之间。5 种鲷均有其特异性扩增片段, 可作为种类鉴别的依据。根据 MEGA2.1 软件的 UPGMA 和 NJ 程序构建的分子系统树显示, 同属鲷属的黄鳍鲷和黑鲷的亲缘关系最近, 其次是二长棘鲷和真鲷, 平鲷与二长棘鲷和真鲷的亲缘关系较近, 与黄鳍鲷和黑鲷较远, 黑鲷和二长棘鲷的亲缘关系最远。两种聚类的结果相一致。研究结果与借助形态学和生化特征进行的传统系统分析具有一致性。在 40 个个体之间遗传距离矩阵中, 最大值达到 0.8916。多数的遗传距离指数在 0.50 ~ 0.85 之间。通过分析, 认为 RAPD 技术对分析属级间的亲缘关系具有一定的适用性。

关键词: 黑鲷, 真鲷, 二长棘鲷, 平鲷, 黄鳍鲷, 亲缘关系, RAPD

中图分类号: Q 348.5 917 文献标识码: A

Study on genetic relationships of Sparidae by RAPD

YANG Hui-rong^{1,2}, JIANG Shi-gui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. Animal Science College, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to study genetic relationships of Sparidae, including *Sparus macrocephalus*, *Parargyrops edita*, *Pagrosomus major*, *Rhabdosargus sarba* and *Sparus latus*. Under predetermined optimal reaction conditions, amplifications with 29 random primers selected from 60 primers gave 200 reproducible and stable bands ranging from 200 to 2500 bp. Each species had its own unique bands used for species identification. The molecular phylogenetic trees constructed by UPGMA and NJ methods of MEGA2.1 indicated *S. macrocephalus* and *S. latus* that belonged to *Sparus* were the most related, while *S. macrocephalus* and *P. edita* Tanaka were the least; *R. sarba* was more related with *P. major* and *P. edita* than *S. macrocephalus* and *S. latus*. Both results were accordant. And they agreed with classical taxonomy based on morphological and biochemical characters. In the matrix of genetic distance resulted from the 40 individuals, the maximal value was 0.8916, and most of them were between 0.50 - 0.85. The results showed RAPD could be efficient for exploring genetic relationships to some extent.

Key words: *Sparus macrocephalus*; *Parargyrops edita*; *Pagrosomus major*; *Rhabdosargus sarba*; *Sparus latus*; genetic relationships; Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

收稿日期: 2004-12-08

资助项目: 国家科技基础工作专项, 广东省科技兴海重大项目(A200099A01); 水科院人才基金项目

作者简介: 杨慧荣(1977 -), 女, 湖北汉川人, 硕士, 从事海洋生物分子遗传学研究。Tel: 020 - 85283529, E-mail: fhy0821@163.com

通讯作者: 江世贵, Tel: 020 - 84195176, E-mail: jiangsg@21cn.com

鲷科(Sparidae)是温热带海洋底栖鱼类,主要分布在印度洋和太平洋,在我国沿海均有分布。国外已经在分子水平对鲷科鱼类的种质资源及其遗传多样性进行了大量研究^[1,2]。我国多数研究仅限于鲷科的基础生物学、繁殖及养殖技术等领域^[3],张雅芝等^[4]从形态学的角度进行了台湾海峡真鲷的种群鉴别研究,但在分子水平对鲷科种质资源状况的研究较少。

随机扩增多态DNA(random amplified polymorphic DNA,RAPD)是建立在PCR技术基础上检测DNA序列多态性和建立分子遗传标记的技术,Williams等^[5]和Welsh等^[6]运用随机引物扩增寻找多态DNA片段作为分子遗传标记。如今RAPD技术在生物的遗传多样性、群体遗传学、分类学以及农牧业的遗传育种等研究中得到了广泛应用^[7-9]。本研究旨在用RAPD技术对鲷科鱼类的黑鲷、真鲷、二长棘鲷、平鲷和黄鳍鲷进行亲缘关系的探讨,以期对鲷科的种质资源研究提供相关的遗传背景资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用鲷科鱼类分别于2002年4、5月间取自胶州湾(青岛)、台湾海峡(厦门)、北部湾(海南)、珠江口(东澳岛)和黄沙水产市场,除平鲷是人工养殖群体外,其它均为天然群体。在取样点取背部肌肉冰冻运回实验室,-70℃保存。

1.2 随机引物及筛选

选用美国Operon公司试剂盒KitA、KitR与KitS共60个10bp随机引物,在事先优化反应条件下,筛选出清晰稳定的引物供扩增,其中无扩增产物、扩增带型模糊及不稳定的结果不作分析。

1.3 基因组DNA的提取

每尾取约100mg肌肉剪碎,加入600μL TEN细胞裂解缓冲液(Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹,pH 9.0; EDTA 100 mmol·L⁻¹;NaCl 200 mmol·L⁻¹)终浓度为2%的SDS和1 mg·mL⁻¹的蛋白酶K,56℃消化过夜,分别用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿抽提,至直无蛋白质中间相,再用2倍体积无水乙醇和1/10体积NaAc(3 mol·L⁻¹,pH 5.2)沉淀,70%乙醇洗涤后,用无离子超纯水溶解,-20℃存放。

1.4 RAPD-PCR“标准”反应体系

PCR反应在Biometra PCR仪上进行。反应总体积25 μL,其中10×Taq Buffer 2.5 μL,Taq Polymerase 0.2 μL(5 U·μL⁻¹),dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹ each)0.5 μL,Mg²⁺(25 mmol·L⁻¹)2.5 μL,引物(10 μmol·L⁻¹)2 μL,模板DNA 25 ng,无离子超纯水 15.3 μL。扩增条件为:94℃预变性5 min,后再进行45个循环,每一循环包括:94℃45 s,36℃45 s,72℃90 s,最后72℃延伸10 min。每次PCR反应均设不含模板DNA的空白对照。扩增产物经1.5%TBE琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,紫外灯光下检测、拍照。

1.5 数据分析

根据RAPD产物的电泳带型,进行个体间与种间的比较分析。按公式 $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$ 计算个体间遗传相似性指数(n_{xy} 是个体 x 和 y 的共有带数, n_x 和 n_y 分别是个体 x 和 y 的扩增带数)。

种间的相似性指数(S_{ij})为种 i 中的个体和种 j 中的个体随机组合所得相似指数的平均值^[10,11]。用公式 $D = 1 - S$ 计算个体间及种间的遗传距离,最后用MEGA2.1软件的类平均聚类法(unweighed pair-group method of analysis,UPGMA)和邻接法(neighbor joining,NJ)进行聚类分析。

2 结果

2.1 RAPD扩增结果

在供筛选的60个随机引物中,有31个引物无扩增产物或因结果不稳定不做进一步分析。其余29个随机引物在5个种的40个个体中扩增结果稳定、重复性佳,共产生200条扩增带,片段大小在200~2500bp之间,多态性带有191条,如果以每条DNA扩增带作一位点计,则多态位点占总位点的比例为95.5%,目前还没有发现在5个种都有相同扩增带的单态引物,所有引物均为多态引物(图版I,II)。

2.2 遗传多样性与聚类分析

对鲷科的5个种进行个体间和种间的遗传多样性分析。种间的遗传距离是:黑鲷和黄鳍鲷之间最小,真鲷和二长棘鲷之间次之,黑鲷和二长棘鲷之间最大(表1)。

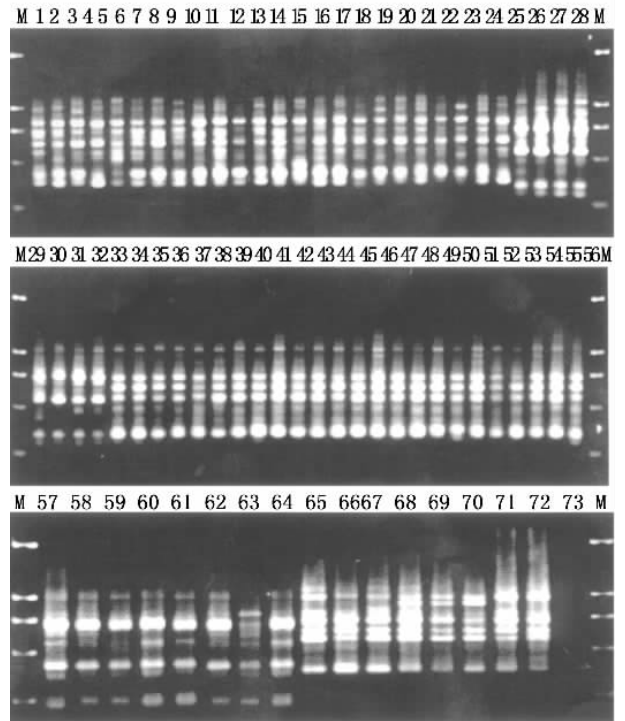
将表2和40个个体间的遗传距离(详细数据略)输入计算机,分别用MEGA2.1软件中的

UPGMA 程序和 NJ 程序进行聚类分析,得到图 1 和图 2 的谱系关系图。黄鳍鲷和黑鲷属于同一个属,表现为它们的亲缘关系最近,首先聚到一起。黄鳍鲷、真鲷、二长棘鲷和平鲷分别属于不同的属,二长棘鲷和真鲷具有较近的亲缘关系,仅次于黄鳍鲷和黑鲷,平鲷与真鲷和二长棘鲷亲缘关系较近,与黄鳍鲷和黑鲷的较远。

3 讨论

分子系统学是一门在分子水平上研究生物的分类和进化关系的学科。上世纪 80 年代以来,随着核酸研究技术的发展,特别是 PCR、RFLP、RAPD 和 DNA 指纹等技术的出现,使得直接对 DNA 大量变异的检测和研究成为可能,并且直接从 DNA 水平研究分子进化也使得分子系统学的研究更加深入。

利用传统的方法进行系统发育研究,少数物种的进化地位仍难以确定,分子生物学方法可以提供一些有用的证据。因为物种进化首先发生在 DNA 水平,然后才反映到形态上。运用分子生物学方法,对传统分类有疑问的类群或形态分类不能解决的类群的系统发育关系进行分析和探讨,也可以对传统的分类系统进行验证。分子系统研究采用的数据通常是 DNA 序列,RFLP 数据也可用于低阶元的系统发育分析。



图版 I 引物 OPA-17 对 5 种鲷科鱼类基因组的 RAPD-PCR 图谱

Plate I RAPD-PCR patterns for five species of Sparidae using primer OPA-17

1-24. 黑鲷 25-32. 二长棘鲷 33-56. 真鲷 57-64. 平鲷 65-72. 黄鳍鲷, M. DNA 分子量标记
1-24. *Sparus macrocephalus*; 25-32. *Parargyrops edita*; 33-56. *Pagrosomus major*; 57-64. *Rhabdosargus sarba*; 65-72. *Sparus latus*; M. DNA marker

表 1 5 种鲷种间的遗传相似系数(对角线以上)和遗传距离(对角线以下)

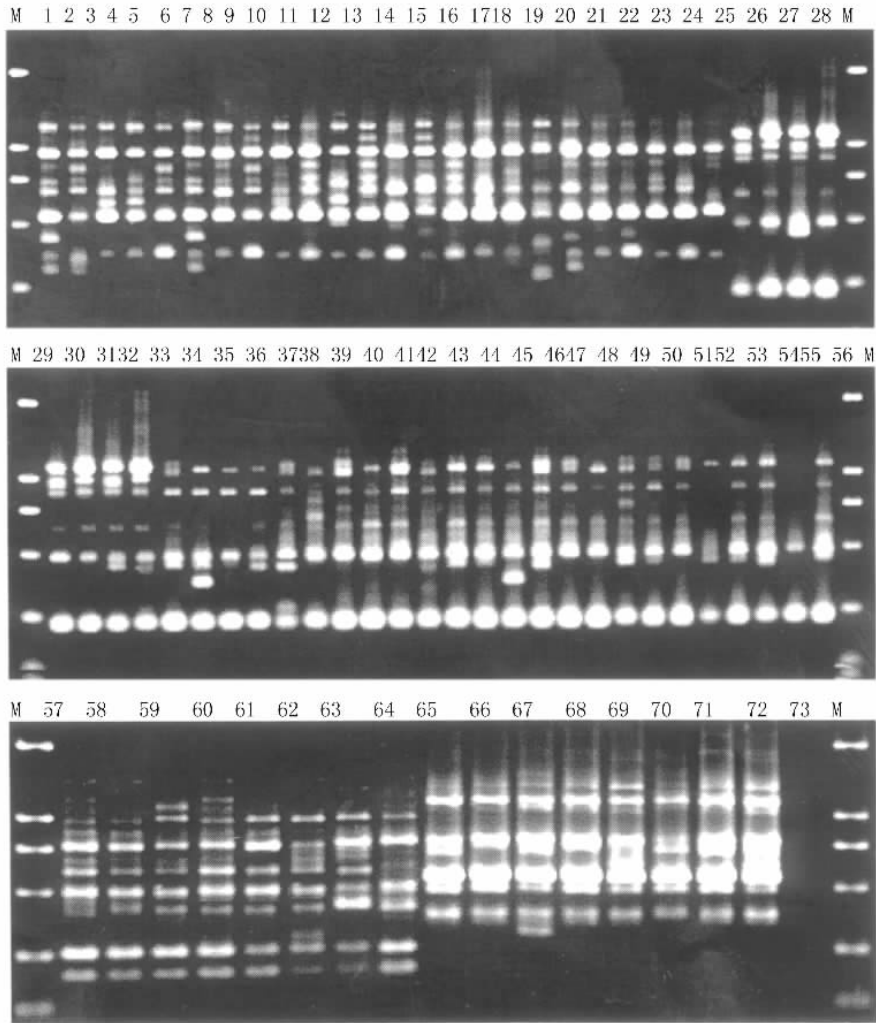
Tab.1 Interpopulation genetic similarities(the up-right of matrix) and distances(the down-left of matrix) in the five species of Sparidae

遗传相似系数和遗传距离 genetic similarities and distances	黑 鲷 <i>S. macrocephalus</i>	二长棘鲷 <i>P. edita</i>	真 鲷 <i>P. major</i>	平 鲷 <i>R. sarba</i>	黄鳍鲷 <i>S. latus</i>
黑鲷 <i>S. macrocephalus</i>		0.2691	0.5478	0.4388	0.6940
二长棘鲷 <i>P. edita</i>	0.7309		0.6218	0.4795	0.3906
真鲷 <i>P. major</i>	0.4522	0.3782		0.5427	0.5149
平鲷 <i>R. sarba</i>	0.5612	0.5205	0.4573		0.5149
黄鳍鲷 <i>S. latus</i>	0.3060	0.6094	0.4851	0.4851	

将 RAPD 分析技术应用于属和属之间的亲缘关系的研究,在植物学领域曾有过报道,但是在动物学领域,大多数研究者仅限于用 RAPD 标记技术研究种级或种级以下类群之间的遗传分化关系,对于属级甚至属级以上分类单元亲缘关系的研究,也有文献报道^[12-14]。本文的研究结果表

明,在动物学研究领域,RAPD 标记技术对于某些属级或属级以上分类单元亲缘关系的探讨,具有一定的适用性。

成庆泰和郑葆珊^[15]认为黄鳍鲷、灰鳍鲷(*S. berda* Forsskal)和黑鲷同归于鲷属(*Sparus* Linnaeus, 1758),平鲷属于平鲷属(*Rhabdosargus*



图版 II 引物 OPR - 17 对 5 种鲷科鱼类基因组的 RAPD - PCR 图谱

Plate II RAPD - PCR patterns for five species of Sparidae using primer OPR - 17

1 - 24. 黑鲷 25 - 32. 二长棘鲷 33 - 56. 真鲷 57 - 64. 平鲷 65 - 72. 黄鳍鲷, M. DNA 分子量标记

1 - 24. *Sparus macrocephalus* ; 25 - 32. *Parargyrops edita* ; 33 - 56. *Pagrosomus major* ; 57 - 64. *Rhabdosargus sarba* ; 65 - 72. *Sparus latus* ; M. DNA marker

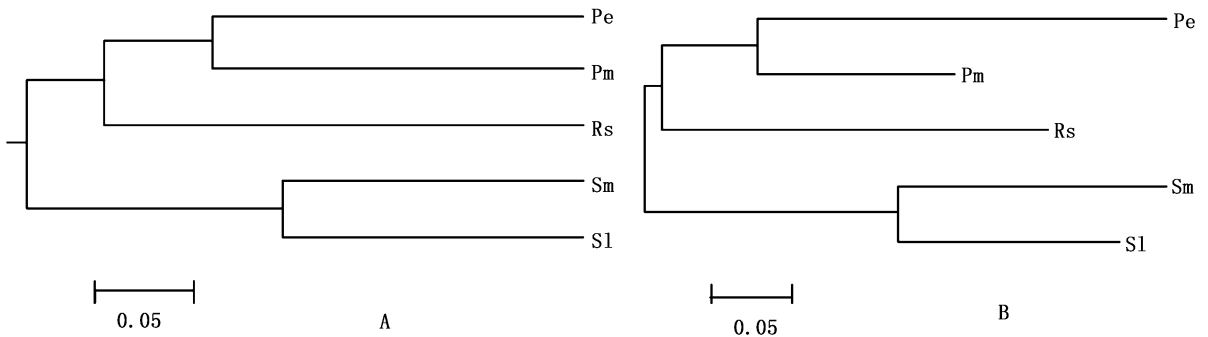


图 1 用类平均聚类法 (A) 和邻接法 (B) 构建 5 种鲷科鱼类的谱系关系

Fig. 1 UPGMA (A) and NJ (B) dendrogram showing the relationships among five species of Sparidae

Pe : 二长棘鲷 ; Pm : 真鲷 ; Rs : 平鲷 ; Sm : 黑鲷 ; Sl : 黄鳍鲷

Pe : *P. edita* ; Pm : *P. major* ; Rs : *R. sarba* ; Sm : *S. macrocephalus* ; Sl : *S. latus*

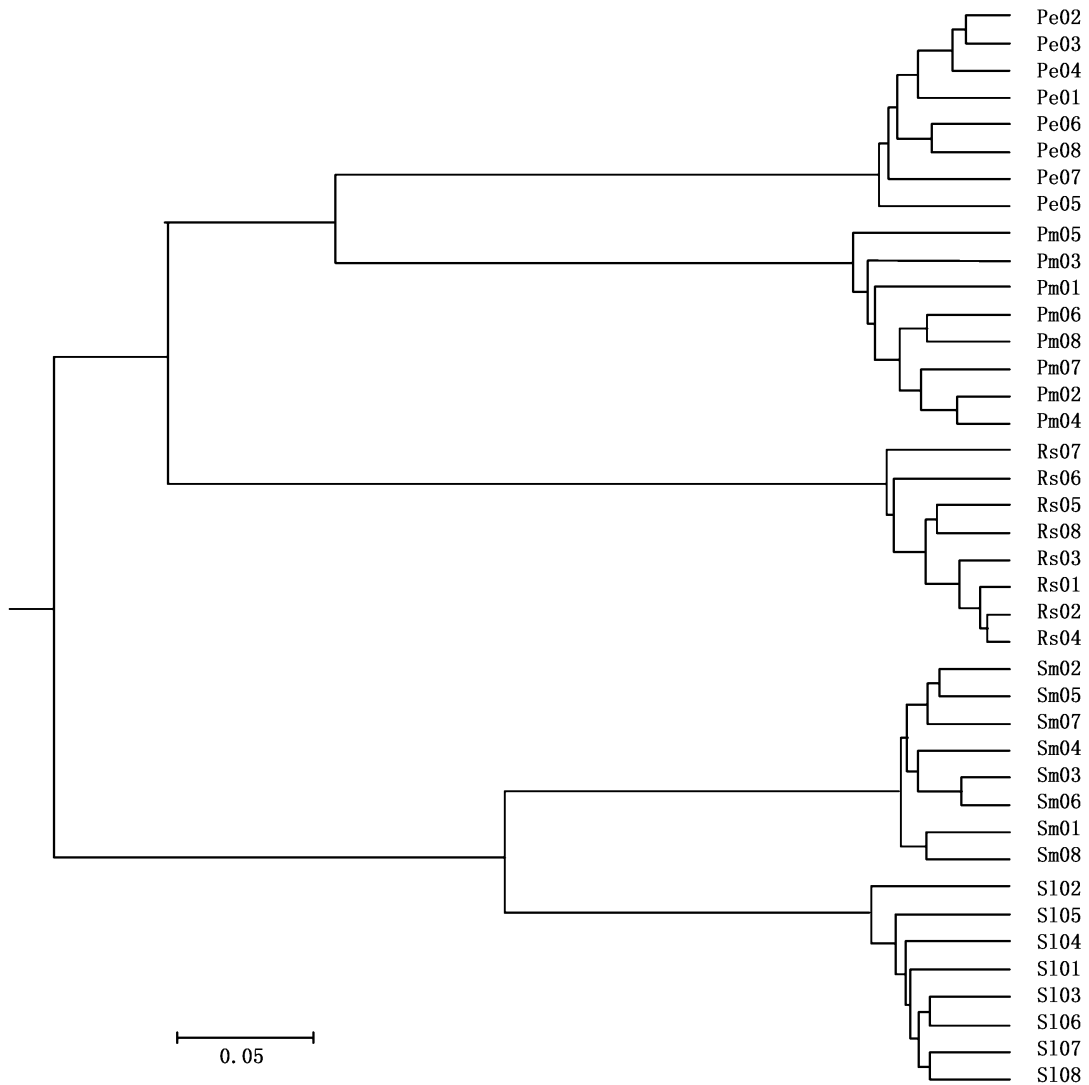


图 2 用类平均聚类法和邻接法构建 5 种鲷科鱼类 40 个个体的谱系关系图

Fig.2 UPGMA and NJ dendrogram showing the relationships among 40 individuals in five species of Sparidae

Fowler, 1933), 二长棘鲷属于二长棘鲷属 (*Parargyrops*), 四长棘鲷(*Argyrops bleekeri* Oshima) 属于四长棘鲷属(*Argyrops*), 真鲷属于真鲷属 (*Pagrosomus*), 黄鲷(*Taius tumifrons* Temminck et Schlegel)属于黄鲷属(*Taius*), 犁齿鲷(*Evygnis japonicus* Tanaka)属于犁齿鲷属(*Evygnis*)。伍汉霖等^[16]将鲷科鱼类的中文名、属名、种名及部分的归属问题进行了更改, 如将黄鳍鲷、灰鳍鲷和黑鲷分别更名为黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus* Houttuyn), 灰鳍棘鲷(*A. berda* Forsskal)和黑棘鲷(*A. macrocephalus* Basilewsky), 同归属于棘鲷属(*Acanthopagrus* Peters, 1855); 原来属于鲷属的平鲷重新归到了平鲷属; 二长棘鲷更名为二长棘犁

齿鲷(*Evygnis cardinalis* Lacepede), 属于犁齿鲷属 (*Evygnis* Jordan et Thompson, 1912); 真鲷更名为真赤鲷(*Pagrus major*), 属于赤鲷属(*Pagrus* Cuvier, 1816); 黄鲷更名为黄牙鲷(*Dentex tumifrons*), 属于牙鲷属(*Dentex*); 四长棘鲷的分类地位则没有改变。

传统的分类方法将平鲷划归到了鲷属, 但是随后的研究认为平鲷应独自成为一属, 即平鲷属。从图 1 和图 2 可以看出: 平鲷并不与同属鲷属的黄鳍鲷和黑鲷具有较近的亲缘关系, 而是单独聚成一支, 这也证实了将平鲷从鲷属中分化出来是合理的。对于真鲷、犁齿鲷、二长棘鲷和四长棘鲷, 通常的分类方法认为它们是属于 4 个不同的

属。江世贵等^[17]通过对真鲷、四长棘鲷和犁齿鲷线粒体细胞色素 b 基因序列的比较研究,结果表明三者间的序列差异介于 6.4% ~ 10.9% 之间,属于种级的分化水平,也就是说它们是归属于同一属的不同种。本文研究表明,真鲷与二长棘鲷种间的遗传距离仅次于黄鳍鲷与黑鲷,但这种分化是否已达到属级的分化水平还有待研究。从真鲷和二长棘鲷幼体的形态特征来看,它们的体色都呈淡红色,真鲷背侧的蓝色小点与二长棘鲷背侧的蓝色细条纹极为相似,二长棘鲷的背鳍棘在幼体时并不明显,只是在后期才呈丝状延长;从它们的生活习性来看,它们都是洄游性鱼类,且在某些水域具有大致相同的洄游习性和洄游路线。在《拉汉世界鱼类名典》中,也有将二长棘鲷和犁齿鲷都化归到犁齿鲷属的说法。所以,本研究初步认为二长棘鲷和真鲷属于同一个属,而真鲷和二长棘鲷的分类地位却有待考证。

29 个随机引物将 40 个鲷科个体全部区分开,没有 2 个个体拥有完全相同的 RAPD 标记;同时,不同物种内的所有个体形成各自的分支,使种与种之间全部相互区分开。此外,鲷属的黄鳍鲷和黑鲷首先聚类在一起,表明同一属内物种之间的亲缘关系最近,这与传统分类学的观点一致。

参考文献:

- [1] Tabata K, Mizuta A. RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in red sea bream *Pagrus major* populations from four locations of western Japan [J]. *Fish Sci*, 1997, 63(2): 211-217.
- [2] Tabata K, Taniguchi N. Differences between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis [J]. *Fish Sci*, 2000, 66(1): 9-18.
- [3] 江世贵,李加儿,区又君,等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系 [J]. *生态学报*, 2000, 20(3): 468-473.
- [4] 张雅芝,马平,杨圣云. 台湾海峡真鲷种群鉴别研究 [J]. *水产学报*, 1997, 21(3): 340-344.
- [5] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- [6] Welsh J, Peterson C, Mc Clelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in mouse: application to strain identification and genetic mapping [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 20: 303-306.
- [7] 徐涤,宋林生,秦松,等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析 [J]. *高技术通讯*, 2001, 12: 1-3.
- [8] Huang J C, Wang W K, Hong K H, et al. Population differentiation and phylogeography of *Hygrophila pogonocalyx* based on RAPDs fingerprints [J]. *Aquat Bot*, 2001, 70(4): 269-380.
- [9] Todd C D, Walker A M, Wolff K. Genetic differentiation of populations of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) ectoparasitic on wild and farmed salmonids around the coasts of Scotland: evidence from RAPD markers [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1997, 210: 251-274.
- [10] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478-484.
- [11] Bardakai F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification [J]. *Heredity*, 1994, 73: 117-123.
- [12] 陈自明,陈毅峰. 用 RAPD 技术对特化等级裂腹鱼类亲缘关系的探讨 [J]. *动物学研究*, 2000, 21(4): 262-268.
- [13] 陈超,石拓,孙曙光,等. 应用 RAPD 标记对东方鲀属进行种类鉴别及其聚类分析 [J]. *海洋水产研究*, 2001, 22(3): 32-36.
- [14] Lavrenchenko L A, Potapov S G, Lebedev V S. The phylogeny and systematics of the endemic Ethiopian *Lophuromys flavopunctatus* species complex based upon random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. *Bioch Syst Ecol*, 2001, 29(11): 1139-1151.
- [15] 成泰庆,郑葆珊. 中国鱼类系统检索(下册) [M]. 北京: 科学出版社, 1987. 128-1130.
- [16] 伍汉霖,邵广昭,赖春福. 拉汉世界鱼类名典 [M]. 台湾: 水产出版社, 1999.
- [17] 江世贵,刘红艳,苏天凤,等. 4 种鲷科鱼类的线粒体细胞色素 b 基因序列及分子系统学分析 [J]. *中国水产科学*, 2003, 10(3): 184-188.