

文章编号: 1004 - 7271(2006)01 - 0017 - 04

用线粒体 DNA D-loop 区序列 探讨盘丽鱼属鱼类系统分类

张 静^{1,2}, 白俊杰¹, 叶 星¹, 劳海华¹, 简 清¹, 罗建仁¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘 要 迄今盘丽鱼属鱼类主要根据形态学特征进行分类, 该属仅有一个种还是两个不同的种存在着争议。为了研究几种盘丽鱼属鱼类的亲缘关系, 从分子水平探讨它们的分类地位, 对绿盘丽鱼(*Symphysodon aequifasciata aequifasciata*)、褐盘丽鱼(*S. a. axelrodi*)和盘丽鱼(*S. discus*)共 12 个个体的线粒体 DNA 控制区(mtDNA D-loop)部分序列进行了分析, 用邻接法和非加权组平均法构建了分子系统树, 得到相同的拓扑结构。结果表明: 盘丽鱼种内个体间的遗传距离为 0.004 ~ 0.015, 绿盘丽鱼与盘丽鱼间的遗传距离为 0.042 ~ 0.050, 褐盘丽鱼与盘丽鱼间的遗传距离为 0.034 ~ 0.038, 绿盘丽鱼与褐盘丽鱼间的遗传距离为 0.050。盘丽鱼和绿盘丽鱼、褐盘丽鱼种间差异与绿盘丽鱼和褐盘丽鱼亚种间差异接近, 推测盘丽鱼可能还没有分化到种的水平。

关键词 盘丽鱼属鱼类; 线粒体 DNA; D-loop; 系统分类

中图分类号: Q 959; S 917 文献标识码: A

Taxonomy of *Symphysodon* based on mitochondrial D-loop gene sequences

ZHANG Jing^{1,2}, BAI Jun-jie¹, YE Xing¹, LAO Hai-hua¹, JIAN Qing¹, LUO Jian-ren¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract The taxonomy of *Symphysodon* is mainly based on morphology, however, there has been some disagreement on whether one species or two about this genus. In order to study the phylogenetic relationship of *Symphysodon* and probe into its taxonomy status on molecular level, we sequenced and compared 276 base pairs of mitochondrial D-loop gene sequences from *S. aequifasciata aequifasciata*, *S. a. axelrodi* and *S. discus*, phylogenetic trees were constructed with neighbor-joining method and unweighted pair group method and obtained the same topology. The results showed that: The genetic distance of the 276 bp D-loop gene sequence was 0.004 - 0.015 among individuals of *S. discus*; 0.042 - 0.050 between *S. a. aequifasciata* and *S. discus*, 0.034 - 0.038 between *S. a. axelrodi* and *S. discus*, and 0.050 between *S. a. aequifasciata* and *S. a. axelrodi*. The difference between two species of *S. discus* and *S. aequifasciata* was close to that of two subspecies between *S. a. aequifasciata* and *S. a. axelrodi*, which indicated that *S. discus* perhaps had not evolved to the level of species.

收稿日期: 2005-03-31

基金项目: 国家科技基础性项目“热带亚热带水产种质资源收集整理保存”(2000DEA30014)

作者简介: 张 静(1979-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 专业方向为水产生物遗传育种。

通讯作者: 罗建仁(1956-), 男, 研究员, 主要从事水产遗传育种与种质资源方面的研究。Tel: 020-81616133, E-mail: fshlo@163.net

Key words :*Symphysodon* ; mitochondrial DNA ; D-loop ; taxonomy

盘丽鱼属(*Symphysodon*)鱼类,英文名称 *Discus*,分类学上属于鲈形目(Perciformes) 丽鱼科(Cichlidae),原产于南美洲的亚马逊河流域,为著名的热带观赏鱼类。1960年,Schultz 将该属分为两个种:盘丽鱼(*S. discus*)和均纹盘丽鱼(*S. aequifasciata*) ,其中均纹盘丽鱼(*S. aequifasciata*)包括3个亚种即绿盘丽鱼(*S. a. aequifasciata*)、褐盘丽鱼(*S. a. axelrodi*)和蓝盘丽鱼(*S. a. haraldi*) ,盘丽鱼(*S. discus*)仅有盘丽鱼(*S. discus*)^[1] ,这种分类方式被大多数鱼类学家接受。就形态特征而言,盘丽鱼除了体侧中央一条明显的深色黑格尔栋与另外三种鱼区分开,其它在外形上都极为相似,而且有时黑格尔栋并未明显表现出来,因而有人认为盘丽鱼属可能只有一个种^[1-4]。

动物 mtDNA 结构简单,母系遗传,进化速率是核 DNA 的 5~10 倍,是系统遗传学理想的分子标记,D-loop 区是 mtDNA 上的一段非编码区,由于受选择压力小而在进化过程中积累了较多的变异,被认为是线粒体基因组上进化最快的部分^[5,6] ,用 D-loop 区来进行近缘种间和种内的系统分类和进化关系的探讨,已成为分子进化研究的一个重要方面。根据 Lee 等^[7]对丽鱼科 10 种鱼的控制区的比较,发现靠近 tRNA-Pro 一端约 300 bp 区域表现出较高水平的核苷酸替换,可能对于研究种内遗传变异最为有用。因此,本研究取 3 种盘丽鱼属鱼类 D-loop 5'端 276 bp 高变区序列进行比较分析,从分子水平上探讨该属鱼类的系统分类问题。

1 材料和方法

1.1 实验材料

绿盘丽鱼(G)原产于普图马约河(Putumayo),褐盘丽鱼(Z)原产于阿莲卡(Alenquer),盘丽鱼(H)原产于尼格罗河(Negro)。上述实验鱼均由珠江水产研究所观赏鱼基地提供。每种实验鱼随机取样 4 尾,每尾剪鳍条少许,-20℃冰箱保存备用。

1.2 DNA 提取

按照上海生工公司(Sangon)DNA 抽提试剂盒提供的方法,提取鳍条总 DNA,4℃保存备用。

1.3 PCR 扩增与序列测定

扩增 D-loop 基因序列的引物是跟据 GenBank 中几种鲈形目鱼类相应的同源序列比较后设计的,引物序列为 L:5'-ATC CTT CCT ACC GCT CAA-3',H:5'-GTG CTT ACG GGA CCT TTC-3',由上海生工公司合成。PCR 反应总体积为 50 μL,其中含有模板 DNA 1.25 μL(40~100 ng/μL),10×PCR Buffer 5 μL,MgCl₂(25 mmol/L)4 μL,dNTP(10 mmol/L)1.5 μL,Taq DNA Polymerase(5 U/μL)0.75 μL(上海生工公司),20 pmol/μL 引物各 1 μL,其余为灭菌双蒸水。扩增条件为:94℃预变性 2 min,94℃变性 50 s,50℃退火 1 min,72℃延伸 3 min,30 个循环后,72℃延伸 7 min。扩增产物用 DNA Gel Extraction Kit(V-gene 公司)纯化回收后,与 T 载体连接,4℃过夜,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,于含氨苄青霉素的 LB 平板上生长过夜,挑选转化子进行质粒提取和重组子筛选。电泳和酶切鉴定目的基因片段的插入。选取重组质粒送 Takara 公司用 ABI 377 全自动荧光测序仪测序。

1.4 数据分析

测得序列用 DNA 分析软件 Vector 8.0 进行同源性比较,并进行人工核对校正,选取 5'端 276 bp 碱基序列用于结果分析。采用 Mega 3.0 软件(Kimura 2-parameter)中的 statistics 统计 DNA 序列的核苷酸替换和遗传距离,并用邻接法(N-J)和非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,构建分子系统树。

2 结果

2.1 盘丽鱼 D-loop 基因部分序列及其差异

本研究对 3 种盘丽鱼属鱼类共 12 个个体 mtDNA D-loop 区 5' 端 276 bp 的碱基序列进行了比较分析,如图 1。绿盘丽鱼 4 个个体的序列完全一致,为一种单倍型,褐盘丽鱼 4 个个体也同为一种单倍型,即绿盘丽鱼和褐盘丽鱼亚种内个体序列之间均没有检测到变异位点,盘丽鱼每个个体为一种单倍型,种内个体序列间共检测到 4 个变异位点,绿盘丽鱼与盘丽鱼序列间共有 15 个变异位点,褐盘丽鱼与盘丽鱼间共有 13 个变异位点,绿盘丽鱼与褐盘丽鱼间共有 14 个变异位点。本研究获得序列已登录 GenBank 数据库,序列号为 AY967711 ~ AY967716。

```

#G CCG AGC TCT GCC AAA AAC AGG TTT GTA CAT ATA TGT AAT TAT ACC ATA AAT TTA TAT [57]
#Z .....-.A..... [57]
##H1 .....-.A..... [57]
##H2 .....-.A..... [57]
##H3 .....-.A..... [57]
##H4 .....-.A..... [57]
#G TAA CCA TAT ATA TAT GAA ATT AAC CAT CTC ATT AGA AAA AGT ACG CTT ATC AAA TTC [114]
#Z .....C.....T.....C.....C.. [114]
##H1 .....C.. [114]
##H2 .....C.. [114]
##H3 .....C.. [114]
##H4 .....C.. [114]

#G CAC CCT CAT ACA ACA ATT AAC TAC TCA AAA AGT ACA TAT ACA TAA AAA TCA TAA TTT [171]
#Z ..... [171]

##H1 .....T..... [171]
##H2 .....C.....T..... [171]
##H3 .....T..... [171]
##H4 .....T..... [171]

#G GAA TGA TAT TTC ACG TCA ACA GAC GAT ATA CTA AGA CCG AGC ACG AAC AAT TCA CCA [228]
#Z .....C.....A...A...T.....T.. [228]
##H1 A...C...T.....A...A...T.....T.. [228]
##H2 .....C...T.....A...A...T.....T.. [228]
##H3 .....C...T.....A...A...T.....T.. [228]
##H4 .....C...T.....A...A...T.....T.. [228]

#G GTC AAG TTA TAC CAA GCA CTC AAC ATC CCG TCA AAT CTC ACA TAT TTA [276]
#Z ..T.....T.....C..... [276]
##H1 .....T..... [276]
##H2 ...G.....T.....C..... [276]
##H3 ...G.....T.....C..... [276]
##H4 ...G.....T..... [276]

```

图 1 盘丽鱼属鱼类 6 种单倍型 D-loop 基因
 Fig. 1 D-loop gene sequences (276 bp) of 6 haplotypes of *Symphysodon*
 G 为绿盘丽鱼, Z 为褐盘丽鱼, H 为盘丽鱼。

由表 1 遗传距离可知,盘丽鱼种内个体间的遗传距离为 0.004 ~ 0.015,绿盘丽鱼与盘丽鱼间的遗传距离为 0.042 ~ 0.050,褐盘丽鱼与盘丽鱼间的遗传距离为 0.034 ~ 0.038,绿盘丽鱼与褐盘丽鱼间的遗传距离为 0.050。绿盘丽鱼个体间遗传距离为 0,褐盘丽鱼个体间的遗传距离也为 0,表 1 中未列出。

表 1 3 种盘丽鱼类属 D-loop 基因 276 bp 序列的遗传距离

Tab.1 Genetic distance for D-loop gene sequences(276 bp) of *Symphysodon*

	G	Z	H1	H2	H3	H4
G	-					
Z	0.050	-				
H1	0.042	0.038	-			
H2	0.050	0.038	0.015	-		
H3	0.046	0.034	0.011	0.004	-	
H4	0.042	0.038	0.007	0.007	0.004	-

注 :G 为绿盘丽鱼 ,Z 为褐盘丽鱼 ,H 为盘丽鱼

2.2 系统进化关系

用 Mega 3.0 软件(Kimura 2-parameter)进行 1000 次的自助重抽样(bootstrap)构建系统进化树 ,结果见图 2 (N-J 法和 UPGMA 法两种构树方法所获得分子系统树的拓扑结构一致(N-J 法构建的系统进化树未列出)。由分子系统树的聚类关系可以看出 ,绿盘丽鱼与褐盘丽鱼分别为一个单倍型各成一支 ,盘丽鱼所有的单倍型聚成一支 ,之后与褐盘丽鱼聚为一支 ,再与绿盘丽鱼聚类 ,这与传统的形态分类不相一致。

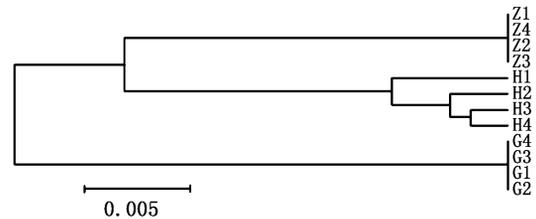


图 2 UPGMA 法构建的系统进化树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree of D-loop gene sequences constructed by the UPGMA method
G 为绿盘丽鱼 ,Z 为褐盘丽鱼 ,H 为盘丽鱼

3 讨论

盘丽鱼属鱼类自 1840 年首次被发现 ,直到 1960 年鱼类学家 Schultz 根据体色花纹和地理分布对其进行了系统的分类 ,将盘丽鱼与另外 3 种同属鱼类分在两个不同的种。对于形态上区分不明显的盘丽鱼属鱼类 ,其分类地位一直存在争议。1986 年 ,Teton 和 Allgayer^[2]从形态学特征研究盘丽鱼属分类时认为其只有一个种 *Symphysodon discus* ,包括两个亚种 *S. d. discus* 和 *S. d. aequifasciata* ,Burgess^[3]和 Jordan^[4]两位学者的研究结果也支持此种分类方式。1995 年 ,Mazeroll 和 Weiss 等经过深入的调查研究后 ,发现早期关于该属鱼类形态和分布的记载可能是错误的、不全面的 ,同时进行了染色体组型分析和电泳试验 ,虽然尚未有结果报道 ,但他们指出通过这些试验有可能推翻 Schultz 的分类方式^[1]。

由序列间变异位点数和遗传距离值结果可知 ,盘丽鱼和绿盘丽鱼、褐盘丽鱼“种间”差异 ,与绿盘丽鱼和褐盘丽鱼亚种间差异在数值上比较接近 ,但远大于绿盘丽鱼、褐盘丽鱼亚种内及盘丽鱼种内个体间的差异 ;同时根据分子系统树的聚类关系所反映的 3 种盘丽鱼属鱼类的亲缘关系 ,推测盘丽鱼可能还没有分化到种的水平 ,这与 Teton 和 Allgayer^[2]的观点相一致。可见 ,本研究通过线粒体 DNA D-loop 区序列分析 ,分子水平的证据支持盘丽鱼与绿盘丽鱼、褐盘丽鱼分类地位一样的论点 ,认为它们同属于一个物种。当然单纯从线粒体 DNA 序列来探讨盘丽鱼属的系统分类问题有其不足之处 ,尚需进一步论证。

参考文献 :

- [1] Konings A. The Cichlids Yearbook[M]. Germany :Cichlid press ,1995 5 :77 - 83 .
- [2] Teton J ,Allgayer R. Encyclopedie du discus[Z]. Aquarium/Sopic , Strasbourg ,1986 .
- [3] Burgess W E. The current state of Discus systematics[J]. Trop Fish Hobby ,1991 ,39 :30 - 40 .
- [4] Jordan D. Amazon discovery 'a new Discus colour form'[J]. Trop Fish Hobby ,1993 42 :16 - 29 .
- [5] Avise J C. Gene tree and organismal histories :a phylogenetic approach to population[J]. Biology Evolution , 1989 43 :1192 - 1208 .
- [6] Rosel P E ,Haygood M G ,Perrin W F. Phylogenetic relationship among the true porpoise(*Cetacean phocoenidae*) [J]. Mol Phyl Evol ,1995 4 (4) :463 - 474 .
- [7] Lee W J ,Conroy J ,Howell W H ,et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. J Mol Evol ,1995 41 :54 - 66 .