

斗鱼属鱼类亲缘关系的 Cyt b 基因序列和 RAPD 分析

王培欣 罗建仁* 白俊杰 叶星 胡隐昌 汪学杰

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380; 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201303)

摘要: 采用 mtDNA Cyt b 基因序列分析和 RAPD 两种分子标记技术, 研究了我国分布的叉尾斗鱼 (*Macropodus opercularis*)、圆尾斗鱼 (*M. chinensis*) 和香港斗鱼 (*M. hongkongensis*) 以及越南的红鳍斗鱼 (*M. erythropterus*) 4 种鱼类之间的亲缘关系。获得 4 种斗鱼 14 条 Cyt b 基因全序列 (1 155 bp), 结合 GenBank 中搜索到的近缘物种同源序列进行分析。从 133 条随机引物中筛选到 36 条引物, 在优化的反应条件下, 10 个群体 96 个个体共扩增出清晰稳定的条带 749 条, 构建矩阵进行分析和聚类。基于 Cyt b 全序列以邻接法和最小进化法构建的系统树及 RAPD 数据 UPGMA 聚类分析的结果都显示, 香港斗鱼和红鳍斗鱼先聚为一分支, 再与叉尾斗鱼聚类, 圆尾斗鱼处于外缘。本研究结果反映了圆尾斗鱼与其他斗鱼的亲缘关系较远, 种间遗传距离为 0.184 5~0.225 3 (Cyt b) 和 0.653 6~0.746 5 (RAPD), 两者为同一单系群中两个独立演化的自然类群; 香港斗鱼与叉尾斗鱼间遗传分化明显, Cyt b 碱基差异为 11.00%, RAPD 遗传距离达 0.577 7, 支持其为独立物种的观点, 且香港斗鱼群体间遗传差异较大, Cyt b 碱基差异为 3.12%, RAPD 遗传距离 0.060 1; 叉尾斗鱼群体间 Nei's 基因多样度和 Shannon 信息指数分别为 0.058 2 和 0.086 9, 而各群体内的数值分别为 0.016 1~0.031 7 和 0.023 5~0.046 7, 表明遗传差异主要来自群体间, 并按分布流域分别聚类。

关键词: 斗鱼属; Cyt b; RAPD; 亲缘关系

中图分类号: Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)05-14-10

Cytochrome b Complete Sequences and RAPD Analysis of the Phylogenetic Relationships among the Fishes of the Genus *Macropodus*

WANG Pei-Xin LUO Jian-Ren* BAI Jun-Jie YE Xing HU Yin-Chang WANG Xue-Jie

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;

College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201303, China)

Abstract: In this study, mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene sequencing and random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique were applied to study the phylogenetic relationships of four species of genus *Macropodus*: *M. opercularis*, *M. chinensis*, *M. hongkongensis* and *M. erythropterus*. The complete sequences of the mitochondrial Cyt b gene (1 155 bp) of 4 species from 14 individuals were sequenced. Combined these sequences with homologous sequences from GenBank Database, *M. opercularis* and *M. concolor* were used as ingroup; *Pseudosphromenus*

基金项目 广东淡水鱼类种质资源库建设项目 (No. 2006B60101029);

*通讯作者, E-mail: fishlo@163.net;

第一作者介绍 王培欣, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物遗传育种; E-mail: fish510@126.com。

收稿日期: 2009-02-09, **修回日期:** 2009-04-22

cupanus, *P. dayi*, *Malpulutta kretseri* and *Batta splendens* were used as outgroup. Moreover, 36 random primers were selected from 133 primers, and 749 reproducible bands were amplified in 96 individuals from 10 populations under optimized reaction conditions. Molecular phylogenetic trees based on Cyt *b* gene sequences were constructed by neighbor-joining (NJ) and minimum evolution (ME) methods, respectively. The results indicated that *M. hongkongensis* was grouped with *M. erythropterus* firstly, then clustered with *M. opercularis*, and *M. chinensis* was in the outer edge. The UPGMA cluster analysis based on RAPD data was identical to the molecular phylogenetic trees based on Cyt *b*. The results reflect that: *M. chinensis* has a distant relationship with other fishes of genus *Macropodus*; genetic distances between species' were 0.184 5 - 0.225 3 (Cyt *b*) and 0.653 6 - 0.746 5 (RAPD); *M. chinensis* and other *Macropodus* represent two independently evolving natural groups of the same monophyletic group. Genetic differentiation among *M. hongkongensis* and *M. opercularis* was obvious, Cyt *b* sequence divergence between species' was 11.00%, genetic distance between species' was 0.577 7 (RAPD), which agrees with the view that *M. hongkongensis* is a valid species. The genetic diversity between different *M. hongkongensis* populations was significant, Cyt *b* sequence divergence was 3.12%, genetic distance was 0.060 1 (RAPD). Nei's gene diversity (H_E) and Shannon's Information index (I) between *M. opercularis* populations were 0.058 2 and 0.086 9, and among populations were 0.016 1 - 0.031 7 and 0.023 5 - 0.046 7, respectively, which show that the genetic diversity of *M. opercularis* mainly between populations too, and the individuals cluster respectively according to their distribution of river basin.

Key words: *Macropodus*; Cytochrome *b*; Random amplified polymorphic DNA (RAPD); Phylogenetic relationships

斗鱼属 (*Macropodus*) 鱼类隶属于鲈形目 (Perciformes) 攀鲈亚目 (Anabantoidei) 斗鱼科 (Belontiidae) 斗鱼亚科 (Macropodinae)^[1,2], 是具有很高观赏价值的小型淡水鱼类。在斗鱼亚科中, 斗鱼属鱼类因卵和早期仔鱼显示独特的形态特征^[3], 一般被认为与其他所有属是姐妹群, 分类位置较孤立^[4]。然而, Ruber 等^[5] 系统发生分析支持斗鱼属为拟丝足鲈属 (*Pseudosphromenus*) 和畸斗鱼属 (*Malpulutta*) 姐妹群的单系进化支, 这两个属的鱼类都曾经被归入斗鱼属, 但因其具有更高发育水平的生殖行为, 已被单列为独立属^[6]。斗鱼属现已知有 5 种^[7], 我国已记录 3 种, 分别为叉尾斗鱼 (*M. opercularis*)、圆尾斗鱼 (*M. chinensis*) 和香港斗鱼 (*M. hongkongensis*), 另外 2 种产于越南, 即越南斗鱼 (*M. spechti*) 和红鳍斗鱼 (*M. erythropterus*)。由于取样不全面和形态性状在鉴别物种中的局限性, 斗鱼属的分类一直存在疑问^[8]。圆尾斗鱼在形态、分布区系和分子遗传等方面都与斗鱼属中其他鱼类有较大差异^[2,8,9], 故圆尾斗鱼与其他斗鱼的亲缘关系也有进一步探讨的必要。香港斗鱼为我国特有且有灭绝危险^[10], 但其与叉尾斗鱼骨骼

结构很相似^[7], 两者从可数和可量性状不能可靠区分^[8], 因此, 研究确定其分类地位对其保育非常重要。

利用传统的形态学方法进行分类研究, 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^[11]。细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*) 在诸多线粒体基因中其结构和功能已被了解得最为清楚, 且能用一些通用引物扩增, 因而被广泛地用来进行鱼类系统进化研究^[12~19]。随机扩增多态 DNA (RAPD) 具有检测灵敏、方便、多态性强等特点, 而且能够比较全面地反映遗传本质, 有很强的揭示种间遗传的能力^[11,20~24]。鉴于以往斗鱼属鱼类分类研究主要依据形态特征, 缺乏系统的分子生物学研究, 本文采用 Cyt *b* 基因测序分析和 RAPD 两种分子标记技术, 从线粒体 DNA 序列与核基因组多态性两方面进行综合分析, 以期探讨斗鱼属鱼类亲缘关系提供分子生物学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 样品根据孟庆闻等^[2] 和 Freyhof 等^[7] 的描述鉴别, 种名、采集地、水系、样

表 1 样品种名、采集地、水系、样本量和代号

Table 1 Species, sampling localities, drainages, sample sizes and code of the samples

种名 Species	采集地点 Collection location	水系 Drainages	样本量 * Sample size	代号 Code
叉尾斗鱼 <i>Macropodus opercularis</i>	广州芳村 Fangcun, Guangzhou	珠江 Pearl River	11 (1)	<i>M. opercularis</i> (GZ)
	清远阳山 Yangshan, Qingyuan	珠江 Pearl River	4 (1)	<i>M. opercularis</i> (YS)
	清远英德 Yingde, Qingyuan	珠江 Pearl River	4 (1)	<i>M. opercularis</i> (YD)
	汕头 Shantou	韩江 Hanjiang River	9 (1)	<i>M. opercularis</i> (ST)
	梅州 Meizhou	韩江 Hanjiang River	4 (1)	<i>M. opercularis</i> (MZ)
	广州市场 Market, Guangzhou		7	<i>M. opercularis</i> (M)
香港斗鱼 <i>M. hongkongensis</i>	揭阳普宁 Puning, Jieyang	练江 Lianjiang River	14 (2)	<i>M. hongkongensis</i> (PN)
	深圳龙岗 Longgang, Shenzhen	独立入海溪流 River discharge Ir- dependently into sea	3 (1)	<i>M. hongkongensis</i> (SZ)
红鳍斗鱼 <i>M. erythropterus</i>	广州市场 Market, Guangzhou		17 (3)	<i>M. erythropterus</i>
圆尾斗鱼 <i>M. chinensis</i>	上海杨浦 Yangpu, Shanghai	长江 Yangtze river	23 (3)	<i>M. chinensis</i>

* 全部样品用于 RAPD 实验,括弧内为用于测序分析的样品数。

* All samples were used to RAPD experiment, the sequenced sample numbers shows in the brackets.

本量和代号见表 1。样品活体静脉取血备用,部分样品取尾鳍鳍条于 95%乙醇保存备用。

血液基因组 DNA 提取用试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit) 购自北京 TIANGEN 生物技术有限公司,随机引物购自上海 Sangon 生物工程有限公司; *Taq* DNA 聚合酶体系购自上海申能博彩公司,鳍条基因组 DNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A. SQ Tissue DNA Kit) 和胶回收试剂盒 (E. Z. N. A. Gel Extraction Kit) 为美国 OMEGA (广州奇特科生物工程有限公司) 公司产品。克隆用的载体 pMD18-T Vector Systems (T 载体) 购自宝生物 (大连) 工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 血液和鳍条分别按试剂盒介绍的方法提取样品基因组 DNA, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量(完整性和纯度),并用分光光度计测其浓度,保存于 -20 备用。

1.2.2 *Cyt b* 基因扩增、测序和序列分析 参考 Ruber 等^[25]的引物,上下游序列分别为 *Cyt b* GuF: 5'-AACCACCGITGATICAACACTACAA-3', *Cyt b* ThrR: 5'-ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG-3',由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应总体积为 50 μ l,包含模板 DNA (40~100 ng/ μ l) 2.5 μ l, 10 \times PCR buffer (包含 Mg^{2+})

5.0 μ l, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.25 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 1.25 μ l, 引物 (20 pmol/ μ l) 各 1.25 μ l, 灭菌双蒸水 38.75 μ l。反应程序: 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 56 退火 30 s, 72 延伸 90 s, 30 个循环; 72 延伸 7 min, 4 保存。反应结束后取 3 μ l 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,剩余扩增产物经胶回收纯化后,与 pMD18-T 载体连接,转化感受态细胞 DH5, 筛选 4 个阳性克隆的菌液送上海英骏生物技术有限公司进行正反向测序,确保测序结果的准确性。

用 DnaSP 4.0^[26] 软件对序列进行拼接并辅以人工核对,得到 *Cyt b* 基因全序列,结合 GenBank 搜索到的叉尾斗鱼 (AF519698)、越南斗鱼 (AY763760),以及拟丝足鲈属的拟丝足鲈 (*P. cupanus*, AF519699)、戴氏拟丝足鲈 (*P. dayi*, AY763764), 畸斗鱼属的克氏畸斗鱼 (*Malpulutta kreiseri*, AF519700) 和槌鱼属泰国斗鱼 (*Betta splendens*, AF519689) 各一条 *Cyt b* 基因全序列,用 Clustal X^[27] 软件进行排序,生成供系统发育分析的矩阵。用 Mega 4.0^[28] 软件统计序列的碱基组成和差异、转换颠换数和遗传距离,用 DNA 序列分析软件 Vector NTI suite 8.0^[29] 进行同源性分析,统计变异位点、简约信息位点和核苷酸多样性、平均核苷酸差异数以

及种间平均核苷酸替代数。用 Mega 4.0 软件邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最小进化法 (Minimum Evolution, ME) 进行 1 000 次的自助重抽样 (bootstrap) 构建系统进化树 (Kimura 2-parameter)。

1.2.3 RAPD 扩增和数据处理 参照 Williams 等的 RAPD 反应条件,对 133 条 Sangon 公司 S 系列随机引物进行筛选。先筛选出扩增条带较多且清晰的引物,再进行两轮可重复性筛选,得到扩增效果稳定的 36 条引物用于 RAPD 分析。进行三因素三水平的正交优化,得到效果较好的反应体系。优化后的体系为 25 μ l,其中:模板 DNA (40 ~ 100 ng/ μ l) 1.0 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μ l, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.4 μ l, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.3 μ l, 引物 (20 pmol/ μ l) 各 0.6 μ l, 用灭菌双蒸水补足 25 μ l。反应程序为:94 预变性 5 min; 94 变性 40 s, 36 退火 50 s, 72 延伸 1 min, 40 个循环; 72 延伸 7 min。扩增产物用 1.5% TBE 琼脂糖凝胶(含适量 EB)电泳分离,紫外凝胶成像系统观察,拍照。根据 RAPD 产物的电泳带型构建原始数据表征矩阵。应用软件 POPGENE 1.32 计算观测等位基因数(A_0)、有效等位基因数(A_e)、Nei's 基因多样性(H_e)、Shannon 信息指数(I)及 Nei's 遗传距离(D)。根据 Nei's 遗传距离值进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果

2.1 斗鱼属鱼类 Cyt *b* 基因序列特征 本研究共获得 4 种斗鱼 14 个个体的 mtDNA Cyt *b* 基因的全序列 (1 155 bp), 登录号 EU932863 ~ EU932876, 加上搜索到的 6 个序列共有 17 个单倍型, 其中清远的 2 个叉尾斗鱼个体共有单倍型 *M. opercularis* (QY), 3 个红鳍斗鱼个体共有单倍型 *M. erythropterus*。单倍型多样性为 0.979 ($P = 0.024$), 核苷酸多样性为 0.158 25 ($P = 0.015$), 平均核苷酸差异数 k 为 181.51。外群拟丝足鲈、戴氏拟丝足鲈和克氏畸斗鱼与其他序列相比, 在 1 138 bp 处有一 T 碱基插入。在

包括外群的总共 1 162 个位点中, 存在 490 个变异位点, 约占 42.2%, 其中包括 404 个简约性位点和 86 个单突变位点。斗鱼属鱼类 Cyt *b* 基因全序列中, T、C、A 和 G 碱基平均含量分别为 33.1%、25.9%、27.5% 和 13.5%, 显示 G 碱基相对缺乏。在三联体密码子的第一位中四种碱基频率相近, 但在第二位中 T 碱基的频率高达 42.5%, 在第三位中 G 碱基只有 3.7%, 表现出 Cyt *b* 基因碱基偏倚明显的共同特征^[30]。序列中转换颠换比 (T_s/T_v) 为 3.72 (Kimura 2-parameter), 显示这些位点没有突变饱和。

基于细胞色素 *b* 基因全序列, 中国斗鱼属鱼类和外群个体间相对遗传距离及碱基差异见表 2。由表 2 可知, 种内遗传变异远小于种间, 最大种内变异出现于香港斗鱼个体间, 遗传距离超过 0.03, 相差 36 个碱基 (3.12%)。叉尾斗鱼 6 个体间遗传距离在 0 ~ 0.006 1 之间, 差异碱基 0 ~ 7 个。种间遗传距离统计结果表明, 圆尾斗鱼与其他几种斗鱼的遗传距离在 0.184 5 ~ 0.225 3 之间, 而其他几种斗鱼之间遗传距离介于 0.139 2 ~ 0.175 4, 其中香港斗鱼与叉尾斗鱼种间遗传距离大致介于 0.14 ~ 0.15 之间, 碱基差异数为 127 (11.00%)。

2.2 基于斗鱼属鱼类 Cyt *b* 基因构建的系统发育树 用邻接法 (NJ) 和最小进化法 (ME) 构建的系统发育树中, 斗鱼属系统发育拓扑结构完全相同, NJ 树见图 1。由图可知, 红鳍斗鱼与越南斗鱼聚成一关系紧密的分支, 两者再与香港斗鱼聚成为姐妹种, 接着与叉尾斗鱼聚类, 最后与圆尾斗鱼组成一单系群。拟丝足鲈属物种和克氏畸斗鱼先聚成一支再与斗鱼属物种聚类, 泰国斗鱼处于系统树最外缘。

2.3 斗鱼属鱼类 RAPD 扩增结果 经筛选得到 36 个随机引物, 在 4 种斗鱼 10 个群体间均能扩增出清晰稳定的条带, 单引物扩增的条带数在 12 ~ 38 条之间 (表 3), 扩增产物的分子量在 250 ~ 3 600 bp 之间, 共检测到 749 个位点, 其中 715 个位点 (95.46%) 呈多态。引物 S112 和 S261 扩增情况见图 2。

表 2 基于细胞色素 b 基因全序列的斗鱼属鱼类和外群相对遗传距离(下三角)及碱基差异(上三角)

Table 2 Genetic distance (below diagonal) and divergence (above diagonal) based on complete cytochrome b sequences in genus *Macropodus* and the outgroup

单倍型 Haplotype *	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>M. chinensis</i> (1)		1	4	184	184	185	186	186	195	196	186	212	216	248	252	247	240
2. <i>M. chinensis</i> (2)	0.0009		3	184	184	185	186	186	195	196	186	212	216	249	252	247	240
3. <i>M. chinensis</i> (3)	0.0035	0.0026		185	185	186	187	187	196	197	187	213	217	250	253	248	243
4. <i>M. opercularis</i> (QY)	0.1845	0.1845	0.1857		4	7	7	5	152	153	145	173	174	266	259	257	246
5. <i>M. opercularis</i> (GZ)	0.1847	0.1847	0.1859	0.0035		5	5	3	150	151	143	171	172	266	257	257	244
6. <i>M. opercularis</i> (SD)	0.1857	0.1857	0.1869	0.0061	0.0044		2	2	148	149	143	171	172	268	257	255	244
7. <i>M. opercularis</i> (MZ)	0.1871	0.1871	0.1883	0.0061	0.0044	0.0017		2	147	148	142	169	170	266	255	255	244
8. <i>M. opercularis</i>	0.1871	0.1871	0.1883	0.0044	0.0026	0.0017	0.0017		149	150	144	171	172	266	257	255	244
9. <i>M. hongkongensis</i> (PN1)	0.1982	0.1982	0.1994	0.1504	0.1482	0.1458	0.1448	0.1471		4	34	162	163	267	263	265	260
10. <i>M. hongkongensis</i> (PN2)	0.1994	0.1994	0.2007	0.15150	0.1493	0.1469	0.1459	0.1482	0.0035		36	162	163	268	266	268	261
11. <i>M. hongkongensis</i> (SZ)	0.1873	0.1873	0.1885	0.1425	0.1403	0.1402	0.1392	0.1415	0.0305	0.0324		162	163	266	265	275	268
12. <i>M. erythropterus</i>	0.2190	0.2190	0.2203	0.1743	0.1720	0.1719	0.1696	0.1720	0.1620	0.1620	0.1622		10	258	260	277	253
13. <i>M. spechti</i>	0.2240	0.2240	0.2253	0.1754	0.1731	0.1730	0.1707	0.1731	0.1631	0.1631	0.1632	0.0088		260	261	279	254
14. <i>B. splendens</i>	0.2595	0.2608	0.2622	0.2829	0.2831	0.2857	0.2831	0.2831	0.2849	0.2863	0.2837	0.2728	0.2754		281	279	301
15. <i>P. cupanus</i>	0.2644	0.2644	0.2658	0.2741	0.2715	0.2713	0.2688	0.2715	0.2786	0.2828	0.2815	0.2740	0.2752	0.3019		107	242
16. <i>P. dayi</i>	0.2577	0.2577	0.2590	0.2712	0.2713	0.2685	0.2686	0.2686	0.2812	0.2854	0.2953	0.2973	0.3000	0.2995	0.1022		239
17. <i>M. kretseri</i>	0.2492	0.2492	0.2532	0.2570	0.2545	0.2544	0.2545	0.2545	0.2753	0.2766	0.2865	0.2667	0.2679	0.3301	0.2545	0.2510	

* 单倍型名称取种名加地名缩写和(或)编号。

* Haplotypes are named as species name plus abbreviation of distribution region and (or) the number.

表 3 用于研究的 RAPD 引物及扩增情况

Table 3 The primers and results of RAPD

引物 Primer	序列 Sequence	扩增带数 Number of bands	引物 Primer	序列 Sequence	扩增带数 Number of bands
S3	CATCCCCCTG	18	S76	CACACTCCAG	22
S4	GGACTGGA GT	20	S82	GGCACTGAGG	14
S5	TGCCCCCTTC	19	S87	GAACCTGCCG	23
S8	GTCCACACGG	18	S91	TGCCCGTCGT	15
S28	GTGACGTAGG	20	S97	ACGACCGACA	25
S29	GGGTAACCC	12	S98	GCCTCATGTG	16
S30	GTGATCGCAG	14	S99	GTCAGGGCAA	23
S32	TCGGCGATAG	17	S105	AGTCGTCC	18
S36	AGCCAGCGAA	14	S106	ACGCATCGCA	28
S38	AGGTGACCGT	15	S108	GAAACACCCC	28
S40	GTTCCGATCC	15	S112	ACGCGCATGT	32
S43	GTCGCCGICA	13	S113	GACGCCACAC	38
S48	GTGTGCCCA	17	S240	CAGCATGGIC	28
S50	GGICTACACC	13	S241	ACGGACGICA	18
S51	AGCGCCATTG	20	S261	CTCAGTGICC	37
S52	CACCGIATCC	14	S262	ACCCGCCCAA	34
S55	CATCCGTGCT	18	S462	TCGGCACGCA	26
S60	ACCCGGICAC	22	S476	CCAACTGCC	26

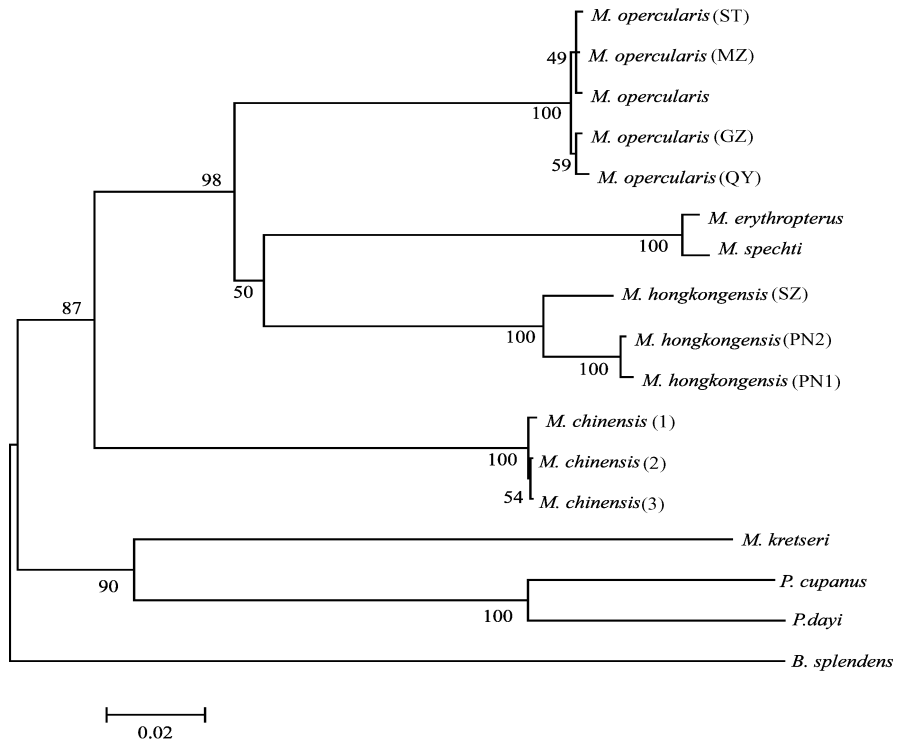


图 1 基于斗鱼属 Cyt b 基因全序列的 NJ 系统发育树

Fig. 1 NJ tree of *Macropodus* based on the complete mitochondrial Cyt b gene sequences

枝端为单倍型名称,取种名加地名缩写和(或)编号,分枝点处的数值为1 000次 Bootstrap 置信值,标尺为基于 Kimura 双参数模型计算的相对遗传距离。*M. opercularis*:叉尾斗鱼; *M. erythropterus*:红鳍斗鱼; *M. spechti*:越南斗鱼; *M. hongkongensis*:香港斗鱼; *M. chinensis*:圆尾斗鱼; *M. kretsleri*:克氏畸斗鱼; *P. cupanus*:拟丝足鲈; *P. dayi*:戴氏拟丝足鲈; *B. splendens*:泰国斗鱼。Branch tips are haplotypes, named as species name plus abbreviation of distribution region and (or) the number. The values of bootstrap confidence level (BCL) of nodes are indicated above the branch (1 000 replications), scale bar is relative evolutionary distance calculated by Kimura 2-parameter method.



图 2 引物 S112(上)和 S261(下)的 RAPD 扩增图谱

Fig. 2 RAPD patterns amplified with primer S112 (above) and S261 (below)

1 ~ 12:圆尾斗鱼; 13 ~ 24:叉尾斗鱼; 25 ~ 31:香港斗鱼; 32 ~ 36:红鳍斗鱼; M:DNA 分子量标准。
1 - 12: *M. chinensis*; 13 - 24: *M. opercularis*; 25 - 31: *M. hongkongensis*; 32 - 36: *M. erythropterus*; M:DNA Marker

2.4 基于 RAPD 数据的斗鱼属鱼类遗传分化及聚类分析 POPGENE 软件的群体遗传变异统计结果见表 4,各群体间 Nei 's 遗传距离见表 5。6 个叉尾斗鱼群体的遗传距离为 0.017 9 ~ 0.057 5,香港斗鱼普宁和深圳群体之间的遗传距离为 0.060 1,种间遗传多样性差异极显著 (P

= 0.004 6),圆尾斗鱼与叉尾斗鱼、香港斗鱼和红鳍斗鱼的遗传距离分别为 0.746 5、0.653 6 和 0.683 7,而叉尾斗鱼与香港斗鱼和红鳍斗鱼的遗传距离分别为 0.577 7 和 0.561 4,香港斗鱼与红鳍斗鱼的遗传距离为 0.494 9。

表 4 斗鱼属群体遗传变异统计

Table 4 Population genetic variation statistics of Macropodus

群体 Population	观测等位基因数 Observed number of alleles, A_0	有效等位基因数 Effective number of alleles, A_e	Nei 's 基因多样性 Nei 's gene diversity, H_E	Shannon 信息指数 Shannon 's Information index, I
圆尾斗鱼 <i>Macropodus chinensis</i>	1.141 5	1.087 0	0.050 0	0.074 2
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (MZ)	1.040 1	1.029 3	0.016 1	0.023 5
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (YS)	1.062 8	1.042 4	0.024 0	0.035 4
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (YD)	1.048 1	1.032 2	0.018 4	0.027 1
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (GZ)	1.082 8	1.052 8	0.030 3	0.044 8
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (M)	1.084 1	1.055 7	0.031 7	0.046 7
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (ST)	1.064 1	1.041 1	0.023 0	0.034 0
叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (total)	1.166 9	1.099 6	0.058 2	0.086 9
香港斗鱼 <i>M. hongkongensis</i> (PN)	1.098 8	1.067 0	0.038 3	0.056 3
香港斗鱼 <i>M. hongkongensis</i> (SZ)	1.025 4	1.017 9	0.010 1	0.014 8
香港斗鱼 <i>M. hongkongensis</i> (total)	1.138 9	1.092 5	0.052 1	0.076 7
红鳍斗鱼 <i>M. erythropterus</i>	1.080 1	1.057 6	0.031 9	0.046 3
合计 Total	1.954 6	1.644 2	0.368 7	0.542 1

表 5 斗鱼属群体间 Nei 's 遗传距离

Table 5 Nei 's genetic distance between populations of Macropodus

群体 Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. 圆尾斗鱼 <i>M. chinensis</i>	-									
2. 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (MZ)	0.775 2	-								
3. 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (YS)	0.758 2	0.055 3	-							
4. 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (YD)	0.763 6	0.057 5	0.020 9	-						
5. 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (GZ)	0.768 4	0.048 4	0.025 6	0.024 9	-					
6. 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (M)	0.757 0	0.045 5	0.021 0	0.033 5	0.017 9	-				
7. 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i> (ST)	0.788 8	0.031 0	0.048 6	0.049 8	0.040 7	0.036 8	-			
8. 香港斗鱼 <i>M. hongkongensis</i> (PN)	0.657 6	0.606 2	0.591 5	0.614 6	0.599 5	0.595 4	0.607 5	-		
9. 香港斗鱼 <i>M. hongkongensis</i> (SZ)	0.703 8	0.625 9	0.607 1	0.632 5	0.614 4	0.606 3	0.624 3	0.060 1	-	
10. 红鳍斗鱼 <i>M. erythropterus</i>	0.683 7	0.599 2	0.590 0	0.572 0	0.581 2	0.588 4	0.580 3	0.503 8	0.529 6	-

根据 Nei 's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析(图 3),红鳍斗鱼和香港斗鱼先聚为一分支,再与叉尾斗鱼聚类,圆尾斗鱼处于系统树外缘,

叉尾斗鱼珠江流域个体与韩江流域个体分别聚类。这与基于 Cyt b 基因序列构建的 NJ 树(图 1)一致。

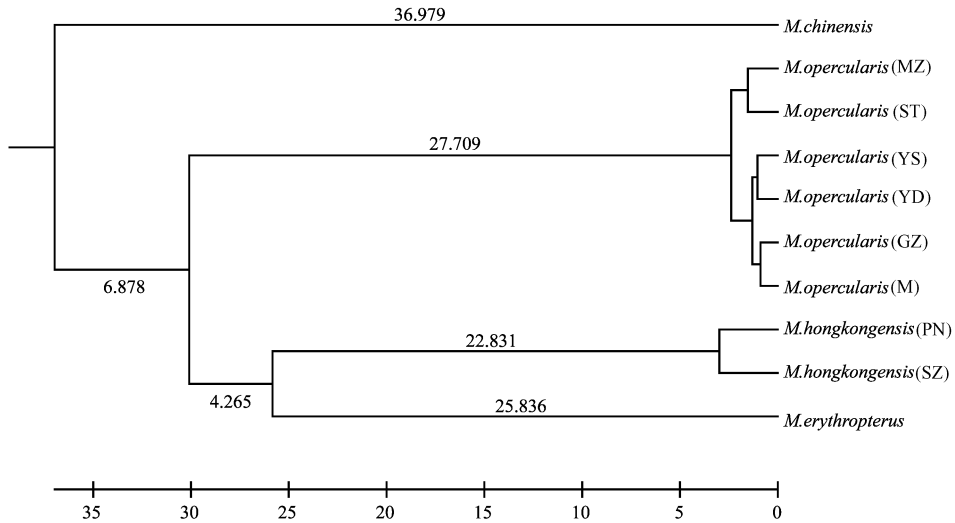


图3 基于 Nei's 遗传距离构建的斗鱼属 10 群体 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for 10 populations of genus *Macropodus* based on Nei's genetic distance

标尺和枝上数据表示分支长度(只显示 > 4), 枝端为种名加地名缩写。 *M. chinensis*: 圆尾斗鱼; *M. opercularis*: 叉尾斗鱼; *M. hongkongensis*: 香港斗鱼; *M. erythropterus*: 红鳍斗鱼。

Scale bar and the numbers above the branch indicating branch length (show > 4 only), branch tips are species name plus abbreviation of distribution region.

3 讨论

3.1 圆尾斗鱼与其他斗鱼的亲缘关系 Wang 等^[9]发现圆尾斗鱼和叉尾斗鱼在 mtDNA D-loop 中存在显著区别, 序列差异数达 142 个。本研究 Cyt b 全序列和 RAPD 分析结果都表明, 圆尾斗鱼与其他斗鱼的遗传距离较其他斗鱼之间的遗传距离大, 在系统树中圆尾斗鱼都处于斗鱼属外缘, 与其他斗鱼形成姐妹群, 是本属最先分化出来的物种, 表明圆尾斗鱼与本属其他鱼类亲缘关系较远。圆尾斗鱼与斗鱼属其他鱼类在形态上也上有很大的差别。圆尾斗鱼尾鳍近圆形, 头部被圆鳞, 躯干部和尾部为栉鳞, 而其他斗鱼尾鳍都是叉状, 头体皆被栉鳞, 圆尾斗鱼鳃耙数 6~13, 而其他斗鱼为 12~21^[2,7]。圆尾斗鱼与叉尾斗鱼在受精卵吸水膨胀后直径、油球直径及胚胎发育过程中出现色素的时间方面都相去甚远^[31,32]。在地理分布方面, 圆尾斗鱼与叉尾斗鱼在长江流域相交错^[33], 圆尾斗鱼主要占据北方, 包括朝鲜半岛和日本, 是斗鱼科分布最北的种类, 而叉尾斗鱼分布于南方, 包括海南、台

湾和越南北部, 香港斗鱼分布于华南地区, 红鳍斗鱼和越南斗鱼分布于越南^[7]。在区系划分上, 圆尾斗鱼大致属于古北区, 其他斗鱼属于东洋区。但本研究 Cyt b 结果证明圆尾斗鱼与其他斗鱼是单系群, 支持 Tzeng 等^[34]的观点。圆尾斗鱼与其他斗鱼应该由同一祖先经辐射适应占据不同的生态环境形成的, 其中圆尾斗鱼由南往北扩散并逐渐适应寒冷环境, 不支持 Wang 等^[9]认为圆尾斗鱼由西朝鲜半岛开始扩散的观点。本实验线粒体与核基因组分析的结果, 结合形态和分布区系可推论圆尾斗鱼与其他斗鱼代表了同一单系群中两个独立演化的自然类群。

3.2 香港斗鱼的分类地位 香港斗鱼由 Dudgeon 和 Chan 在香港记录, 在发现之初被误认为是 *M. concolor*^[35], 且曾被认为局限于香港, 但从 2005 年开始在广东和福建被发现^[8,10]。与叉尾斗鱼相比, 香港斗鱼体侧缺乏红褐和蓝绿相间的条纹, 但两者鳃盖都具一蓝斑, 头顶和前背都散布褐斑, 且在骨骼结构方面很相似^[7]。然而, 本研究 Cyt b 全序列分析表明, 香港斗鱼

与叉尾斗鱼个体间遗传距离大致介于 0.14 ~ 0.15 之间,种间序列差异数高达 127 (11%), RAPD 结果显示两者遗传距离为 0.577 7。近年来动物 Cyt b 基因研究表明,种内个体间的序列差异一般在 0% ~ 4.06% 之间,差异超过 6% 的个体间已有明显的亚种或种的分化^[12]。可见,香港斗鱼与叉尾斗鱼两物种分化明显,支持 Freyhof 等^[7]将香港斗鱼视为独立物种的观点。所构建的系统树中,香港斗鱼都与红鳍斗鱼先聚成为姐妹种,再与叉尾斗鱼聚类。斗鱼属鱼类的单系性表明其具有相同祖先,而由共同祖先适应不同环境分化出的两个种在形态方面可能表现出一定的相似性^[15]。香港斗鱼只分布于生态环境未被破坏的偏僻地区,各栖息地之间有明显的地理隔离。不同产地的香港斗鱼形态上有较大差别,而且本研究 Cyt b 结果显示香港斗鱼普宁和深圳两群体个体间遗传距离超过 0.03,相差 36 个碱基 (3.12%),RAPD 分析显示两群体间遗传距离为 0.060 1, Nei's 基因多样度和 Shannon 信息指数分别为 0.052 1 和 0.076 7。这说明香港斗鱼种内群体间遗传差异非常明显,具有很高的遗传多样性。

3.3 叉尾斗鱼的遗传多样性 分布广的鱼类由于栖息地多样形成了地理种群,由于选择压力,对当地条件的适应形成群体间的遗传差异,丰富了整个物种的遗传多样性^[36]。Wang 等^[9]对台湾叉尾斗鱼线粒体控制区序列的分析结果显示其遗传多样性较低。Tzeng 等^[34]的系统地理学分析显示台湾叉尾斗鱼种群与广东种群为同一个群,广西种群则独立其外,认为台湾叉尾斗鱼是近期从大陆沿海传入,之后种群快速扩张,但分离时间不足以分化出高的遗传多样性。本研究 RAPD 结果显示,叉尾斗鱼 6 群体间 Nei's 基因多样度及 Shannon 信息指数分别为 0.058 2 和 0.086 9,而各群体内的数值分别为 0.016 1 ~ 0.031 7 和 0.023 5 ~ 0.046 7,说明遗传差异主要来自群体间,这与何燕林等^[37]研究圆尾斗鱼遗传多样性的结果相似。本研究中叉尾斗鱼珠江流域个体与韩江流域个体分别聚类,这表明相同流域群体间存在一定程度的基因交

流。

参 考 文 献

- [1] Wakiyama A, Kohno H, Taki Y. Genetic relationships of anabantoid fishes. *J Tokyo Univ Fish*, 1997, **83** (1-2): 93 ~ 102.
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖编著. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [3] Britz R, Cambray J A. Structure of egg surfaces and attachment organs in anabantoids. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 2001, **12**: 267 ~ 288.
- [4] Britz R. The genus *Betta*: monophyly and intrarelationships, with remarks on the subfamilies Macropodinae and Luciocephalinae (Teleostei: Osphronemidae). *Ichthyol Explor Freshwaters*, 2001, **12**: 305 ~ 318.
- [5] Ruber L, Britz R, Zardoya R. Molecular phylogenetics and evolutionary diversification of labyrinth fishes (Perciformes: Anabantoidei). *Syst Biol*, 2006, **55** (3): 374 ~ 397.
- [6] Vierke J. Ethology and phylogeny of the family Belontiidae (Anabantoidei, pisces). *Z Tierpsychol*, 1975, **38** (2): 163 ~ 199.
- [7] Freyhof J, Herder F. Review of the paradise fishes of the genus *Macropodus* in Vietnam, with description of two species from Vietnam and southern China (Perciformes: Osphronemidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 2002, **13** (2): 147 ~ 167.
- [8] Winstanley T, Clements K D. Morphological re-examination and taxonomy of the genus *Macropodus* (Perciformes, Osphronemidae). *Zootaxa*, 2008, **19** (8): 1 ~ 27.
- [9] Wang T Y, Tzeng C S, Shen S C. Conservation and phylogeography of Taiwan Paradise fish, *Macropodus opercularis* Linnaeus. *Acta Zoologica Taiwanica*, 1999, **10** (2): 121 ~ 134.
- [10] Chan B P L, Dudgeon D, Chen X L. Threatened fishes of the world: *Macropodus hongkongensis* Freyhof and Herder, 2002 (Osphronemidae). *Environmental Biology of Fishes*, 2008, **81** (4): 367 ~ 368.
- [11] 杨慧荣, 江世贵. 用 RAPD 技术探讨 5 种鲮科鱼类的亲缘关系. 水产学报, 2006, **30** (4): 469 ~ 474.
- [12] 王义权, 许群山, 彭宣宪等. 通过 Cyt b 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位. 动物学报, 2004, **50** (2): 202 ~ 208.
- [13] 朱世华, 杨迎春, 沈锡权等. 从细胞色素 b 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系. 动物学报, 2006, **52** (3): 514 ~ 521.
- [14] 赵金良, 李思发, 蔡完其等. 基于细胞色素 b 基因序列的东亚鳊类系统发育关系. 动物学报, 2006, **52** (4): 676

- ~ 680.
- [15] 祁得林,郭松长,唐文家等.南门峡裂腹鱼亚科鱼类形态相似种的分类学地位——形态趋同进化实例.动物学报,2006,52(5):862~870.
- [16] 祁得林,郭松长,赵新全.青藏高原裸裂尻鱼属鱼类两个疑难种的分子系统学.动物学报,2006,52(6):1 058~1 066.
- [17] 胡文革,段子渊,王金富等.新疆3种雅罗鱼线粒体 DNA 细胞色素 *b* 序列的差异与系统进化.动物学杂志,2005,40(3):6~11.
- [18] 唐琼英,俞丹,刘焕章.斑纹薄鳅(*Leptobotia zebra*) 应该为斑纹沙鳅(*Sinibotia zebra*).动物学研究,2008,29(1):1~9.
- [19] 项方,邹记兴,邓凤姣等.用细胞色素 *b* 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育.动物学杂志,2004,39(5):13~18.
- [20] 尹绍武,黄海,廖经球等.4种石斑鱼的分子遗传多样性和亲缘关系的 RAPD 分析.海洋学报,2006,28(6):119~126.
- [21] 胡自民,高天翔,韩志强等.花鲈和鲈鱼群体的遗传分化研究.中国海洋大学学报,2007,37(3):413~418.
- [22] 刘思阳,孙玉华,杨帆等.以 RAPD 方法分析岩原鲤分类地位.武汉大学学报(理学版),2004,50(4):477~481.
- [23] 张敏莹,杨秀平,刘焕章.似鲷属鱼类遗传多样性的 RAPD 分析及种的划分问题.水生生物学报,2003,27(3):314~317.
- [24] 杜启艳,常重杰,南萍等.两种泥鳅 RAPD 标记遗传稳定性分析.动物学杂志,2005,40(6):9~13.
- [25] Ruber L, Britz R, Tan H H, *et al.* Evolution of mouthbrooding and life-history correlates in the fighting fish genus *Betta*. *Evolution*, 2004, 58(4):799~813.
- [26] Rozas J, Sanchez-Delbarrio J C, Messeguer X, *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 2003, 19(18):2 496~2 497.
- [27] Thompson J D, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24):4 876~4 882.
- [28] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8):1 596~1 599.
- [29] Lu G, Moriyama E N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*, 2004, 5(4):378~388.
- [30] Hassanin A, Lecointre G, Tillier S. The 'evolutionary signal' of homoplasy in protein-coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny. *C R Acad Sci*, 1998, 321(7):611~620.
- [31] 郑文彪.叉尾斗鱼的胚胎和幼鱼发育的研究.动物学研究,1984,6(3):261~267.
- [32] 周洁,周玉.圆尾斗鱼的胚胎和仔鱼发育的研究.海洋湖沼通报,1995,(2):30~36.
- [33] 于晓东,罗天宏,周红章.长江流域鱼类物种多样性大尺度格局研究.生物多样性,2005,13(6):473~495.
- [34] Tzeng C, Lin Y, Lin S, *et al.* The phylogeography and population demographics of selected freshwater fishes in Taiwan. *Zoological Studies*, 2006, 45(3):285~297.
- [35] Toepfer J, Chan B. On the taxonomic status of the Black Paradise fish *Macropodus concolor* Ahl, 1937, and a natural population in Hong Kong (Teleostei, Belontiidae). *Verh Ges Ichthyol*, 2001, 2:115~118.
- [36] 蒙子宁,杨丽萍,吴丰等.斜带石斑鱼、赤点石斑鱼 RAPD 和线粒体 Cyt *b* 基因序列变异分析.中山大学学报(自然科学版),2007,46(1):75~80.
- [37] 何燕林,肖克宇,唐湘北等.湖南圆尾斗鱼三个地理群体遗传多样性的 RAPD 分析.湖南农业大学学报(自然科学版),2006,32(4):406~411.