

# AFLP 技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究

张俊彬<sup>1,2</sup>, 黄良民<sup>1</sup>, 陈真然<sup>1</sup>

(1 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 2 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 以南沙群岛采获的勒氏笛鲷(*Lutjanus russelli*)、黄笛鲷(*Lutjanus lutjanus*)、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)、紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)、金焰笛鲷(*Lutjanus fulviflamma*)、线纹笛鲷(*Lutjanus lineolatus*)、画眉笛鲷(*Lutjanus vitta*)、马拉巴笛鲷(*Lutjanus malabarius*)、驼背笛鲷(*Lutjanus gibbus*)、约氏笛鲷(*Lutjanus johni*)、金带笛鲷(*Lutjanus vaigiensis*) 11 种笛鲷属的后期仔鱼为材料, 进行了基因组 DNA 的 AFLP (扩增片段长度多态性) 研究, 通过笛鲷仔鱼和成鱼的 AFLP 电泳图谱的比较分析, 将这 11 种笛鲷属的仔鱼成功分开. 研究表明, 最适合的 AFLP 引物组合是 E+ AGC/M + CAA, 由这 11 种笛鲷共扩增出 132 AFLP 位点, 每种笛鲷的 AFLP 条带数为 43~69, 在这 11 种笛鲷中, 共享的 AFLP 条带数仅为 7, 同一种笛鲷仔鱼和成鱼 AFLP 遗传相似度在 90% 以上. 根据这 11 种笛鲷的 Nei 遗传距离对 Neighboring 系统进行进化分析, 并且与传统的笛鲷形态分类进行了比较. 分子生物学可以阐释笛鲷属鱼类的系统进化和遗传亲缘关系, 对传统形态分类学加以完善和补充.

**关键词:** AFLP; 仔鱼鉴定; 分类学; 笛鲷属

中图分类号: Q958.8; Q959.483

文献标识号: A

文章编号: 0253-4193(2005)02-0165-07

## 1 引言

海洋鱼类仔鱼的鉴定是海洋生态学研究、海洋渔业资源研究、水污染评价以及发展鱼类增殖殖事业等工作的重要环节<sup>[1]</sup>. 传统的鱼类分类鉴定基于鱼类的形态学和解剖学特征, 而在鱼类的个体早期发育阶段, 从刚孵化出的带有卵黄囊的仔鱼到幼鱼这段期间, 仔鱼形态会发生很大的变化, 在此变态期, 常用于鱼类仔鱼鉴定的形态学指标如肌节数、色素形状和位置、鳍条数等形态学特征不是固定不变的<sup>[2]</sup>, 这给海洋鱼类的仔鱼鉴定工作带来了很大的困难.

笛鲷属鱼类广泛分布在全世界的热带和亚热带海区<sup>[1]</sup>, 笛鲷属鱼类肉质好, 大部分种类为重要的经济鱼类, 笛鲷属珊瑚礁鱼类, 南海是我国笛鲷属鱼类

的主要栖息地. 笛鲷仔鱼分类鉴定对研究笛鲷的地理分布、活动范围、产卵场的定位以及珊瑚礁的监测保护具有重要意义. 虽然一些笛鲷属种类仔鱼的个体形态学特征已经有过描述<sup>[2~4]</sup>, 但由于笛鲷属仔鱼的数量性状特征的交叉性及其外部特征的相似性, 根据分类学上的形态特征一般只能鉴定笛鲷仔鱼到属的水平<sup>[4]</sup>. 近年来, 物种鉴定越来越强调形态学和分子生物学的结合<sup>[5]</sup>, 通过分子生物学的研究可以为物种鉴定提供客观的遗传标准. 另外, 根据分子生物学的研究可以阐释物种系统进化以及种间的亲缘关系<sup>[6,7]</sup>, 在对笛鲷传统的形态分类学研究上, 国内外分类学家采用的分类标准不同, 在笛鲷属鱼类的形态分类上存在一定的分歧<sup>[8,9]</sup>. 本实验采用 AFLP (扩增片段长度多态性) 技术对笛鲷属鱼类开展分子生物学的研究, 不仅有助于对笛鲷属仔鱼进

收稿日期: 2003-10-06; 修订日期: 2004-7-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40306022); 广东省自然科学基金(04001300).

作者简介: 张俊彬(1971), 男, 湖北省天门市人, 博士, 副研究员, 从事海洋鱼类学研究. E-mail: jbzhang30@vip.sina.com

行有效的鉴定, 而且有助于笛鲷属鱼类系统分类学研究.

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 笛鲷属仔鱼和成鱼样品

在我国出现的笛鲷属鱼类有 22 种, 在南沙群岛出现的种类有 16 种. 16 种笛鲷属成鱼来自于 1999 年 8 月南沙渔业资源调查 捕获的鱼类样品, 每种取 5 尾成鱼样品用于基因组 DNA 的提取; 笛鲷属仔鱼来自于 1999 年 7 月南沙综合调查 捕获的仔鱼样品, 随即选取 50 尾, 每尾笛鲷仔鱼单独地用于基因组 DNA 的提取. 以上样品皆为 70% 酒精固定保存的标本.

#### 2.1.2 实验试剂

DNA 提取试剂盒和核酸酶购自 Qiagen 公司, AFLP 试剂盒购自 Life Technologies 公司, 其他用于本实验的试剂都是分析纯级.

#### 2.1.3 仪器

解剖镜为 OLYMPUS BH-2; PCR 仪为 MJ PTG-200; 紫外分光光度计为 HITACHI U-1500; 电泳仪为 Bio-Rad 公司为 PAC 3000.

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 笛鲷属仔鱼和成鱼的形态学鉴定

笛鲷属仔鱼和成鱼的形态学鉴定工作在实验室进行, 通过肉眼观察到的形态学特征来鉴别笛鲷属成鱼的种类, 另外通过解剖镜观察仔鱼的形态学特征, 并将鉴别出的笛鲷属仔鱼与其他属的仔鱼分开.

#### 2.2.2 基因组 DNA 的提取

采用手术刀刮取少许笛鲷成鱼标本的背部肌肉, 用 TE 缓冲液 (10 mmol/dm<sup>3</sup> Tris, 1 mmol/dm<sup>3</sup> EDTA/pH 8.0) 洗涤两次, 尽可能除去酒精, 每尾鱼大约取 15~20 mg 肌肉用于基因组 DNA 的提取. 仔鱼的整个个体都用于基因组 DNA 的提取, 处理方法同上. 基因组 DNA 的提取按照 Qiagen 公司试剂盒的说明进行. 提取出的基因组 DNA 最终用 AE 缓冲液 (50 mmol/dm<sup>3</sup> 乙酸钠, 10 mmol/dm<sup>3</sup> 二胺四乙酸/pH 5.3) 洗脱, 为了提高 DNA 的得率, 用 AE 缓冲液洗脱两次, 采用 HITACHI U-1500 紫外可见分光光度计测定洗脱液的 A<sub>260</sub> 值, 并估计其 DNA 的含量. 计算公式如下:

样品 DNA 含量等于 50 g/cm<sup>3</sup> A<sub>260</sub> 乘以稀释的倍数.

调整样品 DNA 的浓度大约在 10 ng/mm<sup>3</sup>, 于 -20 °C 存放. 为了减少可能出现的个体遗传多样性对实验结果的影响, 将每种笛鲷种类的 5 尾成鱼样品的基因组 DNA 混合在一起存放. 由于在形态学上很难对笛鲷仔鱼鉴定到种类的水平, 故每个样品的基因组 DNA 单独存放.

#### 2.2.3 PCR 扩增基因组 DNA

PCR 步骤基本遵照美国 Life Technologies 公司的手册进行, AFLP 每个反应体系为 25 mm<sup>3</sup> (内含 1 mm<sup>3</sup> 基因组 DNA, 大约 10 ng), 37 °C 的条件下用 1 mm<sup>3</sup> EcoR 内切酶和 1 mm<sup>3</sup> Mse 内切酶酶切 2 h, 接着在 70 °C 水浴 15 min. 接头的连接采用 T4 DNA 连接酶, 20 °C 反应 2 h. 25 mm<sup>3</sup> 的反应体系预扩增 22 循环, 每个循环为 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 预 PCR 扩增所用引物为 E+ A (5' GACTGCGTACCAATTG+ A3') 和 M+ C (5' GATGAGTCCTGAGTAA+ C3'). 选择性 PCR 扩增反应采用的引物是 E+ 3 个选择性核苷酸和 M+ 3 选择性核苷酸, EcoR 引物 5' 末端连接上 [γ-<sup>32</sup>P] ATP. 选择性 PCR 扩增的步骤是, 首先 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 接着 12 个循环, 每个循环的退火温度逐次降 0.7 °C, 其他条件不变, 最后 23 个循环中的每个循环为 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s.

#### 2.2.4 聚丙烯酰胺电泳

灌制 7% 聚丙烯酰胺 (19:1 acylamide bis; 7.5 mol/dm<sup>3</sup> urea; 1× TBE buffer), 将 5 mm<sup>3</sup> 最终 PCR 产物上样, 电泳 2 h (55 W), 凝胶干燥后, 在 -80 °C 的条件下曝光 24 h, 所用胶片为 Kodak Bio-Max MR X 光胶片.

#### 2.2.5 数据处理

按聚丙烯酰胺凝胶同一位置上 AFLP 条带的有无进行统计, 有条带的记为 1 (包括弱的条带), 无条带的记为 0, 根据 Nei<sup>[10]</sup> 的方法计算遗传相似度 (S) 和遗传距离 (D):

$$S = 2N_{ab} / (N_a + N_b),$$

$$D = 1 - S,$$

式中, N<sub>a</sub> 和 N<sub>b</sub> 分别为 a, b 两个样品的 AFLP 条带数; N<sub>ab</sub> 为 a, b 两个样品共享的 AFLP 条带数.

根据 Nei 遗传距离采用 FreeTree 软件构建 Neighboring 系统进化树, 100 次重复, 做 bootstrap 分析.

### 2.2.6 AFLP 反应中引物对的确定

AFLP 条带的数量取决于基因组 DNA 的复杂性、碱基 GC 的含量以及 AFLP 引物中选择性核苷酸个数<sup>[11]</sup>. 美国 Life Technologies 公司试剂盒提供 8 种 EcoR 引物和 8 种 Mse 引物, 这两类引物可以组成 64 种扩增组合, 对于不同生物基因组 DNA 而言, 不同的引物组合的扩增效果不同. 迄今为止, 未见有文章报道 AFLP 在笛鲷研究上的应用, 有关的文献<sup>[12]</sup>证明选择性 PCR 引物为 E+3 个选择性核苷酸和 M+3 个选择性核苷酸适合鱼虾的 AFLP 分析, 我们在此基础上设计了 4 对引物组合, 以约氏笛鲷为例, 寻找最佳的引物组合. 结果表明, E+AGC 和 M+CAA 引物组合产生的 AFLP 条带数最多, 并且条带比较清晰(图 1), 故本研究采用该对引物组合.

## 3 结果

### 3.1 笛鲷 AFLP 电泳图谱分析比较与仔鱼鉴定

我们首先将 16 种笛鲷成鱼的基因组 DNA 和鉴定到属水平的 50 尾笛鲷仔鱼的基因组 DNA 进行 AFLP 实验, 然后将仔鱼 AFLP 电泳图谱与成鱼的 AFLP 电泳图谱相比较, 确定所分析的笛鲷仔鱼为 11 种. 为了便于分析比较, 我们将这 11 种笛鲷仔鱼和对应的 11 种笛鲷成鱼的最终 PCR 产物分别不同的两块聚丙烯酰胺胶上再进行电泳, 反应条件同上. 这 11 种笛鲷成鱼和仔鱼 AFLP 电泳图谱如图 2 所示.

所有 11 种笛鲷样本共扩增出 132 个 AFLP 位点, 每个样本的 AFLP 条带数为 43~69, 不同笛鲷种类 AFLP 电泳图谱相差很大, 共享的 AFLP 条带数只有 7 个. 约氏笛鲷的 AFLP 条带数最少, 勒氏笛鲷的 AFLP 条带数最多, 但对于同一笛鲷种类, 成鱼和仔鱼 AFLP 图谱呈现很高的相似性, 共享的 AFLP 条带数均超过总数的 94%, 成鱼和仔鱼 AFLP 图谱相似性最高的为驼背笛鲷, 成鱼和仔鱼 AFLP 图谱完全一致, 成鱼和仔鱼 AFLP 图谱相似性最低的为紫红笛鲷, AFLP 多态性条带百分率为 5.45% (见表 1), 但对于不同的笛鲷种类, 即使遗传相似度最接近的马拉巴笛鲷和紫红笛鲷, 其遗传相似度也只有 0.88 (见表 2). 笛鲷种间的遗传差异远大于种内的个体遗传差异, 可以通过笛鲷成鱼和仔鱼 AFLP 电泳图谱的分析比较对这 11 种笛鲷仔鱼进行有效鉴定.

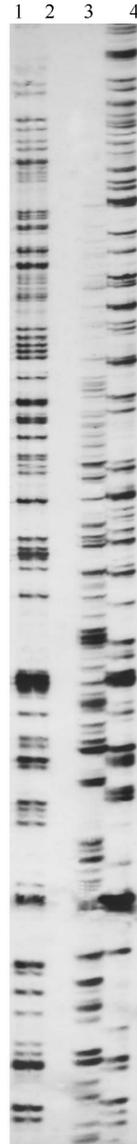


图 1 AFLP 引物对的筛选

1. E + ACG / M + CAA, 2. E + AAC / M + CAT,
  3. E + AGC / M + CAG, 4. E + AGC / M + CAA
- 在第 2 对引物组合中, 无 AFLP 条带产生

### 3.2 笛鲷种类的遗传距离和系统进化树

由于同种笛鲷种类 AFLP 图谱呈现高度相似性, 我们采用笛鲷仔鱼 AFLP 图谱分析笛鲷不同种类的遗传相似度(见表 2), 并在此基础上构建 Neighboring 系统进化树(见图 3). 最大的遗传距离在约氏笛鲷和画眉笛鲷之间, 遗传距离为 0.55, 最小的遗传距离在马拉巴笛鲷和紫红笛鲷之间, 遗传距离为 0.12. Neighboring 系统进化树将这 11 种笛鲷分为 A, B, C 三个组, A 组包括金焰笛鲷、约氏笛鲷、驼背笛鲷、马拉巴笛鲷、紫红笛鲷和红笛鲷, B 组包括画眉笛鲷和线纹笛鲷, C 组包括勒氏笛鲷、黄

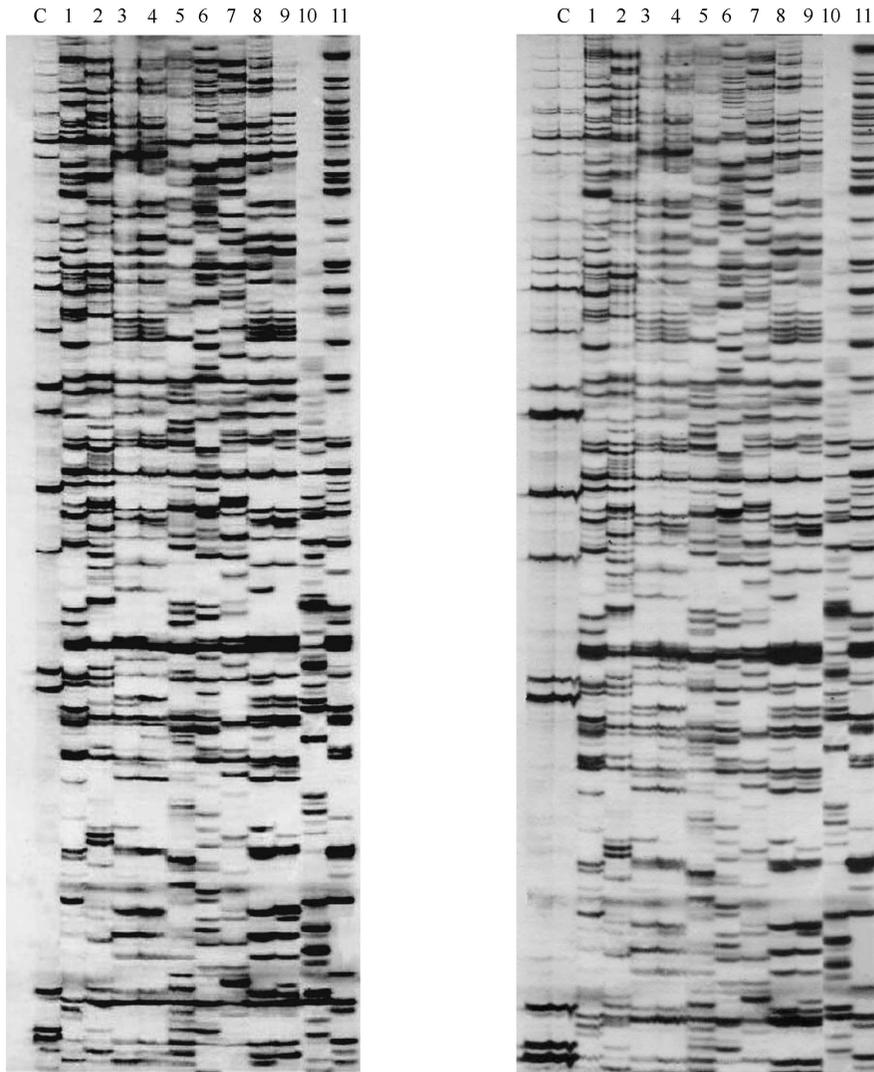


图2 笛鲷仔鱼和成鱼的 AFLP 图谱

左边为仔鱼 AFLP 图谱, 右边为成鱼 AFLP 图谱. 1 和 1. 勒氏笛鲷, 2 和 2. 红笛鲷, 3 和 3. 黄笛鲷, 4 和 4. 紫红笛鲷, 5 和 5. 金焰笛鲷, 6 和 6. 线纹笛鲷, 7 和 7. 画眉笛鲷, 8 和 8. 马拉巴笛鲷, 9 和 9. 驼背笛鲷, 10 和 10. 约氏笛鲷, 11 和 11. 金带笛鲷, C. 对照组(试剂盒提供的西红柿基因组 DNA)

表1 笛鲷样品的 AFLP 条带数统计

种类	仔鱼的 AFLP 条带数	成鱼的 AFLP 条带数	AFLP 多态性条带数	AFLP 多态性条带百分率(%)
1. 勒氏笛鲷	69	67	2	2.89
2. 红笛鲷	59	56	3	5.08
3. 黄笛鲷	52	54	2	3.70
4. 紫红笛鲷	55	52	3	5.45
5. 金焰笛鲷	55	57	2	2.50
6. 线纹笛鲷	67	66	1	1.49
7. 画眉笛鲷	66	63	3	4.54
8. 马拉巴笛鲷	59	56	3	5.08
9. 驼背笛鲷	53	53	0	0.00
10. 约氏笛鲷	44	43	1	2.22
11. 金带笛鲷	50	50	0	0.00
平均				3.00

## 笛鲷和金带笛鲷.

表 2 11 种笛鲷鱼类的遗传相似度(以仔鱼的 AFLP 条带统计)

	勒氏笛鲷	红笛鲷	黄笛鲷	紫红笛鲷	金焰笛鲷	线纹笛鲷	画眉笛鲷	马拉巴笛鲷	驼背笛鲷	约氏笛鲷	金带笛鲷
勒氏笛鲷	1.00										
红笛鲷	0.57	1.00									
黄笛鲷	0.51	0.54	1.00								
紫红笛鲷	0.55	0.53	0.79	1.00							
金焰笛鲷	0.58	0.52	0.58	0.62	1.00						
线纹笛鲷	0.57	0.53	0.50	0.50	0.58	1.00					
画眉笛鲷	0.56	0.56	0.52	0.57	0.62	0.58	1.00				
马拉巴笛鲷	0.55	0.52	0.84	0.88	0.59	0.46	0.54	1.00			
驼背笛鲷	0.53	0.55	0.85	0.82	0.57	0.47	0.54	0.86	1.00		
约氏笛鲷	0.54	0.53	0.56	0.53	0.59	0.52	0.45	0.50	0.56	1.00	
金带笛鲷	0.78	0.69	0.55	0.54	0.63	0.58	0.59	0.51	0.56	0.51	1.00

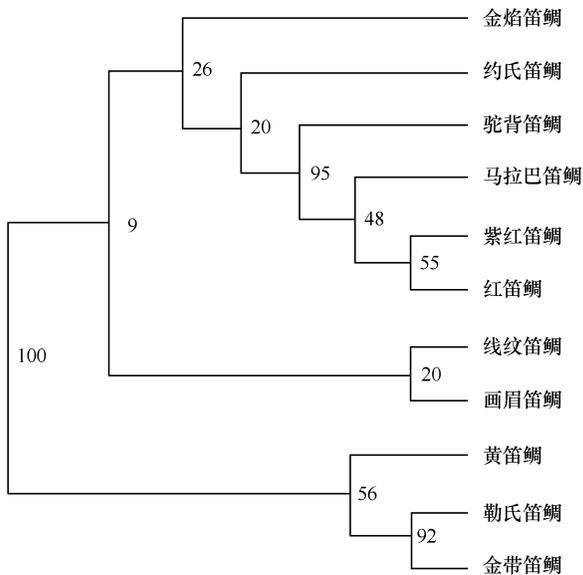


图 3 基于 AFLP 图谱分析构建的 Neighboring 系统进化树每个结点旁的数值为 bootstrap 值

## 4 讨论

近年来, 国外报道应用于鱼类仔鱼鉴定比较有效的分子生物学方法有 RFLP, 多重 PCR 以及特定 DNA 片段的序列分析等<sup>[13]</sup>. 运用 RFLP 前要对所研究对象的某一 DNA 片段进行序列分析, 而且必须保证这几种仔鱼的 DNA 酶切片段长度差异显著, 这样才可以根据 RFLP 酶切图谱将多种仔鱼分开; 多重 PCR 通过特异性引物的设计和严格的 PCR 条件来实现, 但对于系统进化接近的种类而言, 其基因组 DNA 序列整体差异小, 多重 PCR 扩

增的结果往往是相同的, 很难体现种间差异<sup>[14]</sup>; 同源性基因的 DNA 序列分析也是一种有效的鉴别手段, 但相比这些分子生物学方法, DNA 序列分析还需要 DNA 纯化以及克隆等其他实验操作, 实验周期较长, 而且花费较大<sup>[15]</sup>. AFLP 技术是 RAPD 和 RELP 技术的结合, 重复性高, 扩增的条带多, 对实验条件要求不高, 适宜于种和种下水平的物种鉴定和分类学研究<sup>[16]</sup>.

Thome 等<sup>[17]</sup>认为, AFLP 技术的系统误差在 3% 左右, 而本研究中笛鲷种间最小的遗传距离也达到 0.12(马拉巴笛鲷和紫红笛鲷之间), 完全可以抵消 AFLP 技术系统误差带来的影响. 并且实验结果表明, 11 种笛鲷属鱼类的种间遗传差异远大于种内的个体遗传差异. 综合以上两方面的分析, 证明完全可以通过笛鲷成鱼和仔鱼 AFLP 图谱的分析比较对这 11 种笛鲷仔鱼进行有效鉴定.

尽管笛鲷属鱼类的迁移活动范围很大, 但种内的个体遗传差异往往不明显, Johnson 等<sup>[18]</sup>对生活在澳大利亚西北部海区的 3 种笛鲷鱼类的群体遗传做过研究, 相距最远的采样点之间的距离达 2 800 km, 同工酶分析的结果表明, 同一种类的个体遗传差异性很小. 对生活在墨西哥湾的多种笛鲷鱼类的群体遗传研究<sup>[19, 20]</sup>也证明, 在墨西哥湾, 每种笛鲷只存在单一的种群, 并且种内个体遗传差异小于 5%. 一般引起物种种群间遗传差异的原因有: (1) 看不见的天然障碍(如海流); (2) 鱼类活动范围的限制; (3) 天然隔阂; (4) 地球演化和鱼类进化等历史原因<sup>[20]</sup>. 南沙海区辽阔, 无大型天然屏障, 为鱼类长距离的遗传信息交流提供了可能. 本研究证明, 针

对某一笛鲷种类,其成鱼和仔鱼的 AFLP 图谱呈现很高的相似性,这表明,南沙海区笛鲷属鱼类种群个体间存在高度的基因流,至于在南沙海区,这些笛鲷种类是否存在单一的种群还有待进一步的研究.适用于种类鉴定的分子生物学方法必须能体现种内的遗传同质性和种间的遗传异质性<sup>[21]</sup>,笛鲷属鱼类的种内个体遗传差异越小,对种间遗传差异比较的干扰就会越少,这正是本研究所期待的.

对笛鲷属鱼类的分类学地位和形态分类学标准一直存在争议,欧美研究者利用同工酶、RFLP 技术以及线粒体 DNA 片段序列分析对分布于大西洋的笛鲷属的分类学地位和种间的遗传亲缘关系进行了研究,并且以此为基础修正了传统的笛鲷形态分类学标准,然而分布于我国海域的大部分笛鲷种类不同于大西洋的笛鲷种类,相关笛鲷属鱼类的分类学工作需要我国科研工作者的深入研究.本研究中 Neighboring 系统进化树将这 11 种笛鲷分成 3 组,大部分结点的 bootstrap 值 (> 50%) 证明 Neighboring 系统进化树所揭示的笛鲷种类间的系统进化和遗传亲缘关系基本上是可可靠的.由于目前在国内外都缺乏有关笛鲷属仔鱼的形态分类资料,我们将 Neighboring 系统进化树与基于成鱼形态学特征的

传统形态分类学进行了比较.通常鱼类传统形态学分类标准基于的形态特征有:(1) 体表颜色;(2) 色斑;(3) 条纹;(4) 鳍棘和鳍条数;(5) 侧线的位置等. Allen<sup>[8]</sup> 和成庆泰<sup>[9]</sup> 曾对笛鲷属的分类学进行过研究,但两人对笛鲷属的形态分类学标准存在分歧,成庆泰将侧线的位置和鳍棘和头骨特征作为第一分类要素,Allen 强调体型,体表颜色、条纹等显著性外表特征为第一分类要素.本研究中 AFLP 分析的结果支持 Allen 关于笛鲷属的系统形态分类学观点,在这 11 个种类中,红笛鲷、紫红笛鲷、马拉巴笛鲷、驼背笛鲷的遗传相似度最高(见表 2),这 4 种笛鲷在笛鲷属中属于成体体型较大的种类,体表皆为红色,无任何条纹,外形也比较相似,Neighboring 分析也表明它们的遗传关系比较接近(见图 3),线纹笛鲷和画眉笛鲷属于体型较小的笛鲷种类,它们在 Neighboring 系统进化树中聚在一起(见图 3).Allen 关于笛鲷属的系统形态分类学观点较好地体现了笛鲷属鱼类的系统进化关系.本研究是利用分子生物学技术对我国笛鲷属分类学开展的初步研究,对我国笛鲷属鱼类的系统进化和遗传亲缘关系还需要更多的分子生物学资料来佐证,只有基于此,我国笛鲷属鱼类的形态分类学标准才会更客观和科学.

## 参考文献:

- [1] NEWMAN S J, CAPPO M, WILLIAMS D M. Age, growth and mortality of the stripey, *Lutjanus carponotatus* (Richardson) and the brown-stripe snapper, *L. vitta* (Quoy and Gaimard) from the central Great Barrier Reef[J]. Fish Res Australia, 2000, 48: 263-275.
- [2] MUSIY I, SERGIYENKO V A. Finerlings of the genus *Lutjanus* (Lutjanidae, Perciformes) from the Gulf of Aden[J]. J Ichthyol, 1977, 17: 151-154.
- [3] 张仁斋, 陆淑芳, 赵传钢, 等. 中国近海鱼卵和仔鱼[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
- [4] OKIYAMA M. An Atlas of the Early Stage Fishes in Japan[M]. Tokyo: East Sea University Press, 1987.
- [5] 刘振辉, 孔杰, 刘萍, 等. RAPD 技术在中国对虾群体鉴别上的应用[J]. 海洋学报, 2003, 23(4): 67-71.
- [6] 黎中宝, 林鹏. 我国不同纬度白骨壤种群遗传多样性和遗传分化的研究[J]. 海洋学报, 2002, 24(1): 142-147.
- [7] 周涵韬, 林鹏. 海桑属红树植物遗传多样性和引种关系研究[J]. 海洋学报, 2002, 24(5): 98-106.
- [8] ALLEN G R. Genus *Lutjanus*. Margaret M Smith, Phillip C Heemstra. Smiths Sea Fishes[M]. New York: Spriger-Verlag, 1986.
- [9] 成庆泰, 郝葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [10] NEIMASATOSHI, LI, WEN HSIUNG. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5259-5273.
- [11] HULATA G. Israel. Pullin R S V. Tilapia Genetic Resources for Aquaculture[M]. ICLARM Conf Pro 16, Manila, Philippines. Penang: World Fish Press, 1998. 48-51.
- [12] AGRESTI J J, SEKI S, CNAANI A, et al. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci[J]. Aquaculture, 2000, 185: 43-56.
- [13] ASAHIDA T, YAMASHITA Y, KOBAYASHI T. Identification of consumed stone flounder, *Kareius bicoloratus* (Basilevsky), from the stomach contents of sand shrimp, *Crangon affinis* (De Haan) using mitochondrial DNA analysis[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1997, 217: 153-163.
- [14] ROCHA-OLIVARES A. Multiplex haplotype-specific PCR: a new approach for species identification of the early life stages of rock fishes of the species-rich genus *Sebastes* Cuvier[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 231: 279-290.

- [15] SEBASTIO P Z P, NERI T M. Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semi-preserved[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (3): 1 194 1 199.
- [16] VOS P, HOGERS M, REIJANS M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4 407 4 414.
- [17] THOME J, GONZALEZ D O, BEEBE S, et al. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection[J]. Crop Sci, 1996, 36: 1 375 1 384.
- [18] JOHNSON M S, HEBBERT D R, MORAN M J. Genetic analysis of population of north-western Australian fish species[J]. Aust J Mar Freshwat Res, 1993, 44: 673 685.
- [19] GOLD J R, RICHARDSON L R. Mitochondrial DNA variation among red fishes from the Gulf of Mexico[J]. Fish Res, 1994, 20: 137 150.
- [20] CAMPER J D, BARBER R C, RICHARDSON L R, et al. Mitochondrial DNA variation among red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1993, 3: 154 161.
- [21] LIEVENS S, GOORMACHTIG S, HOLSTERS M. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(17): 3 459 3 468.

## Studies on the larval identification and taxonomy of *Lutjanus* by AFLP technology

ZHANG Jun-bin<sup>1,2</sup>, HUANG Liang-min<sup>1</sup>, CHEN Zhen-ran<sup>1</sup>

(1. South China Sea Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** The Nansha Coral Reefs (also called Spratly Archipelago) water area, which is located in the South China Sea, is the main habitat and spawn area for the species of *Lutjanus* in China. The larvae of many closely related species, such as those of the genus *Lutjanus*, are different to be distinguished morphologically. A PCR-based fingerprinting technology called amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used in the characterization and identification of 11 species of the genus *Lutjanus* sampled from the Nansha Coral Reefs. The optimal AFLP pattern was obtained with primer combination of E+AGC/ M + CAA selective nucleotides. Totally, 132 AFLP loci were found from these species and the number of AFLP bands for each species varied from 43 to 69. More than 90% of AFLP bands were species-specific and only 7 markers were fixed to all species examined. All larvae were successfully identified to 11 *Lutjanus* species by comparing AFLP fingerprints of larvae with that of adults. Moreover, the phylogenetic analysis (Neighboring) of species relationship based on the AFLP data was compared with the current morphological taxonomic data. It suggests that AFLP analysis is a reliable method for the larval identification and taxonomy of the genus *Lutjanus*.

**Key words:** AFLP; larval identification; taxonomy; genus *Lutjanus*