

# 5种裸腹群体遗传变异及亲缘关系的初步分析

张鹏<sup>1</sup>, 赵文<sup>1</sup>, 刘卫东<sup>2</sup>, 殷旭旺<sup>1</sup>, 孙静娴<sup>1</sup>

(1. 大连水产学院 辽宁省省级高校水生生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对 5 种裸腹 (蒙古裸腹 *Moina mongolica*、多刺裸腹 *M. m. acrocopa*、直额裸腹 *M. rectirostris*、微型裸腹 *M. m. icnura* 和近亲裸腹 *M. affinis*) 的亲缘关系及群体遗传变异程度进行了研究。在优化反应条件下, 对 21 个引物进行了扩增, 从中筛选出 6 个带型清晰且重复性好的引物用于分析, 共扩增出 161 条多态性谱带, 片段长度为 421 ~ 19 329 bp。根据遗传距离结果, 利用 Mega 2.1 软件包中的 UPGMA 和 NJ 程序进行聚类分析, 结果表明: 5 种裸腹种间、群体间的遗传分化程度较大, 进化地位的高低顺序为近亲裸腹 > 直额裸腹 > 多刺裸腹 > 蒙古裸腹 > 微型裸腹。

**关键词:** 裸腹; RAPD 分析; 遗传变异; 进化; 亲缘关系

**中图分类号:** Q786; S963.21 **文献标识码:** A

裸腹 *Moina* 分布广, 生活周期短, 易于培养, 营养价值高, 是许多水产经济动物重要的天然饵料之一。目前, 对裸腹的研究主要集中在水温、饵料等对其生长、生殖的影响<sup>[1-2]</sup>以及耐盐性、海水驯化<sup>[3]</sup>、室外规模化培养<sup>[4]</sup>等, 而对其遗传基础的研究, 尤其是应用分子遗传标记技术对裸腹种间、群体间乃至个体间遗传变异程度的研究却少见报道, 这对推断其种类进化历程, 探究群体变异分化程度以及对传统的形态分类学进行验证补充等方面造成了一定的影响。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 是一类良好的分子遗传标记技术<sup>[5-7]</sup>。在枝角类方面, Hellsten 等<sup>[8]</sup>曾对两种象鼻 *Bosmina* sp. 种群的基因变异进行过 RAPD 检测。迄今, 国内仅陆开宏等<sup>[9]</sup>以蒙古裸腹和多刺裸腹为材料, 对枝角类 RAPD 扩增条件进行了摸索和优化。在此基础上, 作者对 5 种裸腹共 12 个群体进行了 RAPD 检测, 初步分析其种间亲缘进化关系及群体间的遗传变异程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用种来源见表 1, 其中蒙古裸腹在室内海水中 (盐度为 30) 培养, 投喂海水培养的蛋

白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa*; 其它淡水裸腹在淡水中培养, 投喂淡水培养的蛋白核小球藻。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 对裸腹空腹培养 1 ~ 2 d, 解剖镜下观察腹腔内无蛋白核小球藻后进行 DNA 的抽提。DNA 提取参考安瑞生等<sup>[10]</sup>的方法, 略有改动。用紫外分光光度法测定 DNA 的浓度和纯度, OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 比值为 1.8 ~ 2.0, 浓度为 33.5 ~ 99.5。

1.2.2 随机引物的筛选 使用上海 Sangon 公司合成的随机引物, 筛选出能扩增出清晰、稳定的带型, 且条带数较多的随机引物用于本试验, 无扩增产物、扩增带型模糊极不稳定的, 不做进一步分析, 筛选出 6 个引物的序列见表 2。

1.2.3 PCR 扩增反应 扩增反应体系: 模板 DNA 50 ng/μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, dNTPs 0.1 mmol/L, 引物 0.2 μmol/L, TaqDNA 聚合酶 1 U, 补加双蒸馏水至 25 μL。扩增反应程序为: 94 °C 下预变性 5 min; 94 °C 下变性 30 s, 38 °C 下退火 1 min, 72 °C 下延伸 2 min, 如此进行 40 个循环; 循环结束后在 72 °C 下再延伸 7 min。每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的阴性对照, 扩增产物经 15 g/L 的琼脂糖电泳检测, EB 染色, 紫外灯下观察, 凝胶成像系统拍摄并记录结果。

收稿日期: 2006 - 07 - 19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371112, 30671625); 辽宁省自然科学基金资助项目 (20022100)

作者简介: 张鹏 (1979 -), 男, 博士研究生。 通讯作者: 赵文 (1963 -), 男, 教授, 博士。 E-mail: zhaowen@dlfu.edu.cn

表 1 种来源及生殖方式

Tab. 1 The origin and reproductive pattern of the test *M. oina*

序号 No.	种类 Species	群体 Populations	代号 Code	地点 Site	采集日期 Date	生殖方式 Reproductive pattern
1	蒙古裸腹 <i>M. mongolica</i>	内蒙群体	NM	内蒙古锡林郭勒	2002 - 10	孤雌生殖
2	蒙古裸腹 <i>M. mongolica</i>	晋南群体	JN	山西运城	1992 - 06	孤雌生殖
3	多刺裸腹 <i>M. m. acrocopa</i>	大连群体	DD	辽宁大连	2003 - 06	孤雌生殖
4	多刺裸腹 <i>M. m. acrocopa</i>	天津群体	TD	天津	2004 - 07	孤雌生殖
5	多刺裸腹 <i>M. m. acrocopa</i>	运城群体	YD	山西运城	2004 - 10	孤雌生殖
6	直额裸腹 <i>M. rectirostris</i>	东营群体	DZ	山东东营	2003 - 05	孤雌生殖
7	直额裸腹 <i>M. rectirostris</i>	上海群体	SZ	上海	2004 - 07	孤雌生殖
8	微型裸腹 <i>M. m. icnua</i>	上海群体	SW	上海	2004 - 07	孤雌生殖
9	微型裸腹 <i>M. m. icnua</i>	大连群体	DW	辽宁大连	2003 - 06	孤雌生殖
10	微型裸腹 <i>M. m. icnua</i>	唐山群体	TW	河北唐山	2004 - 05	孤雌生殖
11	微型裸腹 <i>M. m. icnua</i>	运城群体	YW	山西运城	2004 - 10	孤雌生殖
12	近亲裸腹 <i>M. affinis</i>	唐山群体	JQ	河北唐山	2004 - 05	孤雌生殖

1.3 数据处理

记录电泳后凝胶上清晰可见的扩增条带, 出现扩增条带的记为“1”, 相应位点无扩增条带的记为“0”, 将此结果输入 Phyto1软件, 按照如下公式计算遗传相似性系数 *I*和群体间的遗传距离 *D*:

$I = 2N_{xy} / (N_x + N_y), D = 1 - I,$

其中:  $N_x$ 为群体 *X*扩增得到的全部条带数;  $N_y$ 为群体 *Y*扩增得到的全部条带数;  $N_{xy}$ 为群体 *X*和群体 *Y*共有的条带数。通过 Mega 2.1 软件, 采用非加权分组平均法 (unweighted pair - group method

with arithmetic mean, UPGMA) 和邻近法 (neighbor - joining, NJ) 进行聚类分析。

2 结果

2.1 随机引物的筛选及扩增结果

在 21 个随机引物中, 有 6 个能扩增出清晰、稳定的带型, 共扩增出 161 条多态性谱带, 平均每条引物扩增 26.8 条带, 分子量为 421 ~ 19 329 bp (表 2)。图 1 为引物 S27、S18、S40、S30、S24、S29 的扩增图谱。

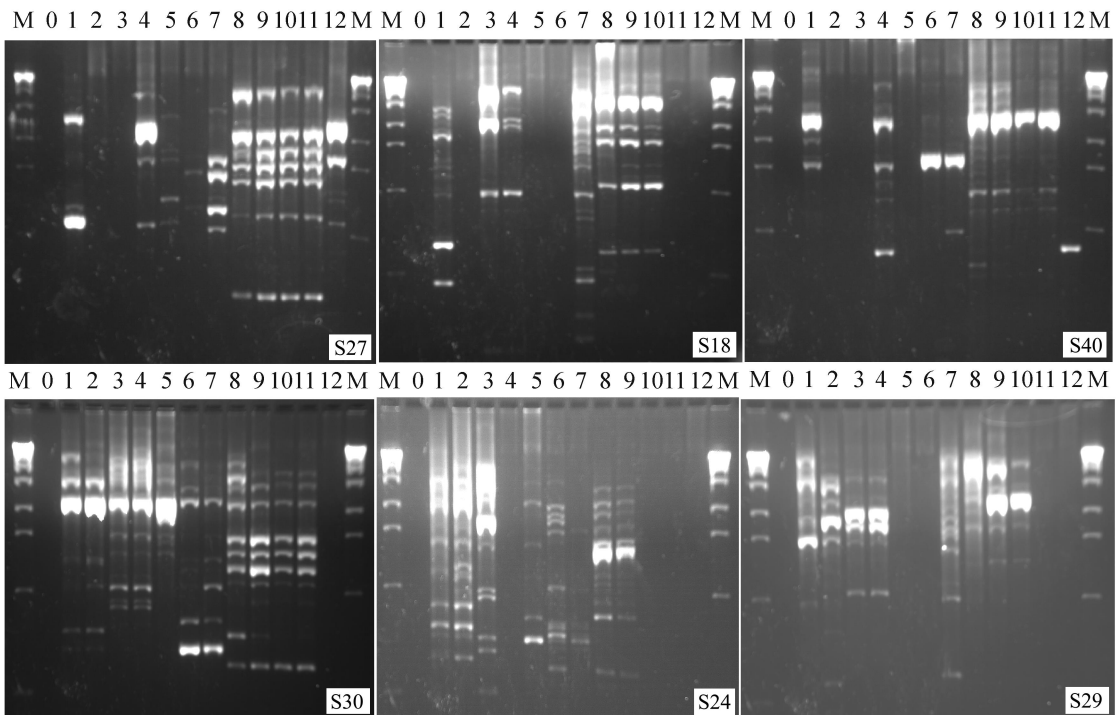


图 1 S27、S18、S40、S30、S24、S29引物的 RAPD 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of RAPD products with primer S27, S18, S40, S30, S24, and S29

注: M - EcoT14 分子量标记, - EcoT14 DNA marker; 0 阴性对照, control without DNA; 1 ~ 12 依次代表第 1 ~ 12 个裸腹 群体, representing strains 1 - 12 of *M. oina* in turn.

表 2 筛选出的引物编号、序列和扩增结果  
Tab.2 Codes and sequences of primers selected and their amplification results

引物 Primers	序列 (5' - 3') Sequence	扩增带数 Numbers of bands
S29	GGGTAACGCC	23
S24	AA TCGGGCTG	33
S30	GTGA TCGCA G	31
S27	GAAACGGGTG	20
S18	CCACA GCA GT	30
S40	GTTGCGA TCC24	
总带数 Total bands		161

2.2 遗传距离与聚类分析结果

根据 6 个引物的电泳结果统计 0 - 1 矩阵, 将结果输入 Phytool 软件计算遗传距离 (表 3), 将遗传距离数据输入 Mega 2.1 软件, 利用 UPGMA 和 NJ 程序分别进行聚类分析, 得到系统发生树 (图 2)。

从表 3 可见, 近亲裸腹 (JQ) 与其它种类的遗传距离最小值为 0.8235, 最大值达到了

1.0000; 直额裸腹 两个群体 (DZ和 SZ) 的遗传距离也较大, 为 0.7966; 蒙古裸腹 两个群体 (NM和 JN) 的遗传距离为 0.5077; 多刺裸腹 3 个群体 (DD、 TD和 YD) 的遗传距离为 0.4737 ~ 0.6923; 而微型裸腹 4 个群体 (SW、 DW、 TW和 YW) 的遗传距离为 0.2427 ~ 0.5714, 相比其它种类来说分化程度要小些, 但其遗传距离数值也明显偏高。应用 UPGMA 法和 NJ 法得到的系统发生树 (图 2) 完全一致, 可分为 I、 II、 III、 IV 和 4 个类群。第 I 类群为近亲裸腹 (JQ); 第 II 类群为微型裸腹, 其中 SW 和 DW 聚为一支, TW 和 YW 聚为另一支; 第 III 类群为多刺裸腹 的 3 个群体 TD、 DD和 YD 聚为一类; 在第 III 类群中, 蒙古裸腹 的 NM 和 JN 两群体先聚在一起, 然后再与直额裸腹 的 SZ 群体聚类, 最后与 DZ 群体聚类。从聚类结果来看, 5 种裸腹 进化地位的高低顺序为近亲裸腹 > 直额裸腹 > 多刺裸腹 > 蒙古裸腹 > 微型裸腹。

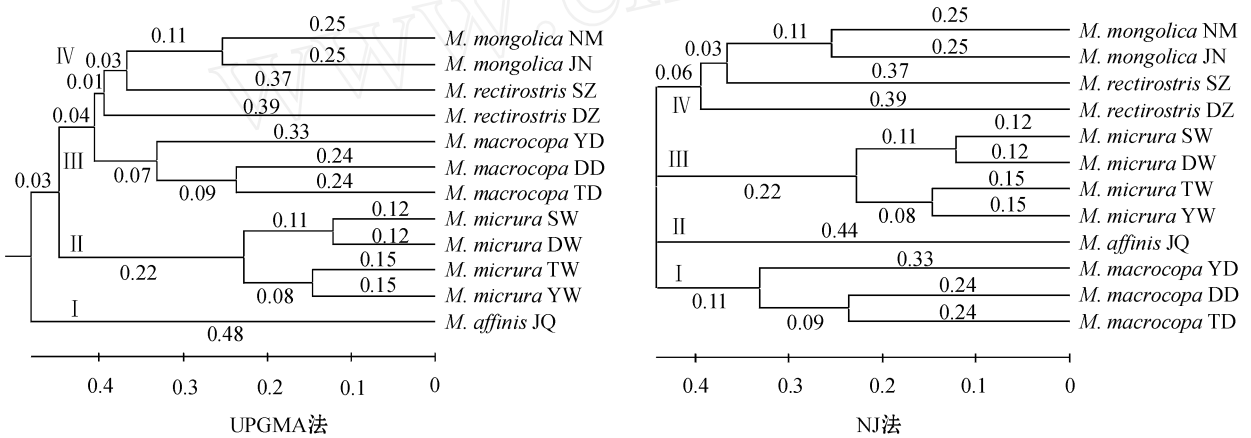


图 2 用 UPGMA 法和 NJ 法构建的 12 个裸腹 群体的系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree among 12 populations of Moina by UPGMA and NJ

表 3 12 个裸腹 群体的遗传距离

Tab.3 The genetic distance among 12 populations of Moina

代号 Code	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NM	1	0											
JN	2	0.5077	0										
DD	3	0.7879	0.6981	0									
TD	4	0.7391	0.8571	0.4737	0								
YD	5	0.8033	0.7917	0.6327	0.6923	0							
DZ	6	0.8305	0.7391	0.7872	0.9200	0.8571	0						
SZ	7	0.7436	0.7231	0.7879	0.8261	0.8689	0.7966	0					
SW	8	0.8242	0.8974	0.9494	0.8049	0.9189	0.9167	0.9121	0				
DW	9	0.8000	0.8701	0.9231	0.7778	0.8904	0.9437	0.8889	0.2427	0			
TW	10	0.8551	0.9286	0.8947	0.8333	0.9231	0.9600	0.8841	0.4878	0.2840	0		
YW	11	0.9298	0.9545	0.9111	0.8750	0.9000	0.9474	0.9649	0.5714	0.4783	0.2917	0	
JQ	12	0.9535	1.0000	1.0000	0.8235	0.8462	1.0000	0.9535	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0

### 3 讨论

#### 3.1 种间、种内各群体间的遗传变异分化

本试验中, 5种裸腹 种间、种内各群体间的遗传距离数值差异较大, 说明其遗传分化程度较高。原因可能在于裸腹 分布广泛, 生境复杂, 繁殖周期短, 其体内基因组变异的机率更大, 特别是那些不会造成明显表型性状改变的非编码区 DNA 序列的变异, 容易积累和保存下来, 可以通过 RAPD 技术得到检测, 从而为群体的分化提供了条件。另外, Petrussek 等<sup>[11]</sup>曾对来自中欧和澳大利亚种群的两个克隆体系进行杂交试验和 mDNA 序列分析, 证实了微型裸腹 种内存在遗传上隔离的群体这一假说。研究结果表明, 该微型裸腹 复合类群中至少存在两个亲缘种, 这从另一个侧面反映了裸腹 高度遗传分化的特点, 与本研究的结论不谋而合。笔者认为, 裸腹 种间、群体间存在着丰富的遗传变异度, 使其能够适应复杂的生境, 维系物种繁衍, 也为新种 (亚种) 的进化打下了基础。

#### 3.2 种间亲缘进化关系

本研究中, 作者采用染色体核型分析技术研究了 5种裸腹 种间遗传变异程度, 结果为直额裸腹 >近亲裸腹 >多刺裸腹 >微型裸腹 >蒙古裸腹 (待发表)。不难看出, 在种间亲缘关系的判断上核型分析的结果与本研究的结论一致, 即直额裸腹 和近亲裸腹 进化地位较高, 多刺裸腹 始终处于进化的中间过渡阶段, 而微型裸腹 与蒙古裸腹 则最为原始。但在判断进化地位相近的种即直额裸腹 与近亲裸腹 之间以及微型裸腹 与

蒙古裸腹 之间的进化顺序方面存在分歧。这可能与本研究中所用引物数量较少有关, 同时也反映出进化是一个极为复杂的过程, 物种间的亲缘进化关系可以在各个不同水平上得以体现, 不能简单地依据某种方法做出定论, 只有将各种研究方法相互结合、补充验证, 才能得出较为确切的结论。

### 参考文献:

- [1] 何志辉. 温度对多刺裸腹 (*Moina macrocopa straus*) 的繁殖力和内禀增长能力的影响 [J]. 大连水产学院学报, 1983 (1): 13 - 20.
- [2] 何志辉, 阎立光, 张毅. 食物条件对蒙古裸腹 生长、生殖和内禀增长率的影响 [J]. 大连水产学院学报, 1988, 11 (3, 4): 21 - 26.
- [3] 徐善良, 王丹丽. 三种淡水枝角类海水驯化的比较研究 [J]. 上海水产大学学报, 1998, 7 (3): 253 - 257.
- [4] 徐长安. 蒙古裸腹 生产性培养的初步研究 [J]. 海洋科学, 1998 (4): 12 - 13.
- [5] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999: 1 - 2.
- [6] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. 随机扩增多态 DNA 规范化反应体系的探讨 [J]. 生物技术通报, 2002 (3): 40 - 43.
- [7] 焦锋, 楼程富. RAPD 技术应用中的一些问题及对策 [J]. 西北农业学报, 2000, 9 (4): 98 - 102.
- [8] HELLENSTEN M E, SUNDBERG P. Genetic variation in two sympatric European populations of *Bosmina* spp. (Cladocera) tested with RAPD markers [J]. Hydrobiologia, 2000, 421 (1): 157 - 164.
- [9] 陆开宏, 石志猛, 王扬才. 枝角类 RAPD 条件优化和遗传多样性分析 [J]. 上海水产大学学报, 2003, 12 (4): 303 - 307.
- [10] 安瑞生, 谭声江, 陈晓峰. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进 [J]. 昆虫知识, 2002, 39 (4): 311 - 312.
- [11] PETRUSEK A, CERNY M, AUDENAERT E. Large intercontinental differentiation of *Moina micrura* (Crustacea: Anomopoda): One Less Cosmopolitan Cladoceran? [J]. Hydrobiologia, 2004, 526 (1): 73 - 81.

## Preliminary analysis of genetic variability and phylogenetic relationship among five species of *Moina* sp (Cladocera)

ZHANG Peng<sup>1</sup>, ZHAO Wen<sup>1</sup>, LU Wei-dong<sup>2</sup>, YN Xu-wang<sup>1</sup>, SUN Jing-xian<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Hydrobiology in Liaoning Province's University, Dalian Fisheries Univ., Dalian 116023, China;

2. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China)

**Abstract:** The genetic variability and phylogenetic relationship among five species of *Moina* sp. were determined by RAPD technique. Under the optimal reaction conditions, twenty-one random primers had been used for amplification, in which 6 were found to produce reproducible and stable fragments. There were 161 polymorphic fragments. The length of amplified fragment was ranged from 421 to 19329 bp. Based on the heredity distance, the program UPGMA and NJ of Mega software were applied for cluster analysis. The genetic diversity among different taxa and populations ranged from high to low as the following: *M. affinis* > *M. rectirostris* > *M. macrocopa* > *M. mongolica* > *M. micrura*. The RAPD markers could be helpful in the study of *Moina*'s population differentiation and the identification of *Moina*.

**Key words:** *Moina*; RAPD analysis; genetic variability; evolution; phylogenetic relationship