

## 不同地理居群角突臂尾轮虫遗传多样性的 RAPD 分析

项贤领 席贻龙 胡好远

(安徽师范大学生命科学学院; 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室;  
安徽省重要生物资源保护和利用研究重点实验室, 芜湖 241000)

### RAPD ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF DIFFERENT *BRACHIONUS ANGULARIS* STRAINS

XIANG Xian-Ling, XI Yi-Long and HU Hao-Yuan

(College of Life Science, Anhui Normal University; Provincial

Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Higher Education;

Key Laboratory of Conservation and Exploitation of Biological Resource in  
Anhui Province, Wuhu 241000)

关键词: 角突臂尾轮虫; 居群; DNA 多态性; RAPD; 遗传距离

Key words: *Brachionus angularis*; Strains; DNA polymorphism; RAPD; Genetic distance

中图分类号: Q173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0363-04

轮虫(Rotifera)是各类水体中广泛分布的一类浮游动物。单巢目轮虫所产的休眠卵具有随风力和鸟兽的迁徙而传播的特征, 这是轮虫大多数种类广泛分布的重要原因之一。分布于不同地理区域中的轮虫由于经历了长期的自然选择, 往往在形态和生态特征等方面存在着显著的差异<sup>[1,2]</sup>, 但这种差异究竟是由轮虫表型的可塑性还是由遗传差异造成目前尚未达成共识。国外学者曾对分布于世界不同地区、地理间距较远的、且在形态和生态特征等方面具有明显差异的褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)不同品系间的遗传差异进行了等位酶和微卫星DNA研究, 发现它们间的确存在着遗传差异<sup>[3,4]</sup>。胡好远等的研究也表明不同地理居群的角突臂尾轮虫 *B. angularis* 在形态和生态特征等方面也存在着显著差异, 但其遗传差异如何仍需进一步的研究。

随机扩增多态DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技术具有检测快速、操作简便、灵敏度高、成本低等特点, 已被广泛应用于生物遗传多样性的检测<sup>[5,6]</sup>, 也曾被用于轮虫种间关系研究<sup>[7]</sup>, 然而将 RAPD 技术应用于轮虫遗传多

样性和不同地理居群轮虫间的系统关系研究尚未见报道。本文以各类水体中广泛分布的、且在水产养殖上有较大应用前景的角突臂尾轮虫为对象, 运用 RAPD 技术对采自广州、芜湖和青岛等地的不同地理居群轮虫进行了基因组DNA多态性研究, 旨在从DNA水平上探讨其遗传多样性、遗传差异及系统进化关系。

#### 1 材料与方法

1.1 轮虫的采集和培养 实验用角突臂尾轮虫采自广州、芜湖和青岛等地(表1)。实验室内在 25±1℃、自然光照(光照强度约 130lx, L:D=14:10)条件下对各居群进行“克隆”培养。培养液采用 Gilbert<sup>[8]</sup> 配方(pH=7.3), 所用饵料为 HB-4 培养基培养的、处于指数增长期的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*), 培养时间在 1 个月以上; 当各“克隆”轮虫的个体数达 1000 只以上时用轮虫培养液纯化, 饥饿 24h 后用 70% 酒精固定保存。

收稿日期: 2005-05-19 修订日期: 2005-12-20

基金项目: 安徽省优秀青年基金资助项目(04043050); 安徽省自然科学基金资助项目(00042416); 安徽省高校“生物环境与生态安全”省级重点实验室重点资助项目(2004sys002); “重要生物资源保护和利用研究”安徽省重点实验室专项基金资助项目

作者简介: 项贤领(1978—), 男, 安徽肥东县人, 硕士, 助教; 主要从事浮游动物生态学研究

通讯作者: 席贻龙, E-mail: ylxi1965@yahoo.com.cn

表 1 用于实验的样品  
Tab. 1 Samples used in the experiment

样品 Samples	采集地 Localities	克隆数 Numbers of clone
广州居群(GZ Strain)	广州市华南师范大学校园内一池塘 A pond in Huanan Normal University, Guangzhou City	2
芜湖居群(WH Strain)	芜湖市镜湖 Lake Jinghu, Wuhu City	2
青岛居群(QD Strain)	青岛市中山公园一池塘 A pond in Zhongshan Park, Qingdao City	5

**1.2 基因组 DNA 的提取** 用玻璃粉法提取基因组 DNA<sup>[9]</sup>。具体方法为: 离心获得轮虫样品, ddH<sub>2</sub>O 冲洗 2 次, 置 1.5mL Eppendorf 管中, 加 500 $\mu$ L DNA 提取缓冲液(0.5% SDS, 25mmol/L EDTA, 25mmol/L NaCl, 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 和 20 $\mu$ L 蛋白酶 K(20 $\mu$ g/mL), 置 60℃水浴 2h; 加 500 $\mu$ L 8mol/L 预热后的硫氰酸胍和 40 $\mu$ L(1:1)的洁净玻璃粉乳液, 混匀后置 37℃水浴 1h, 不时摇动; 取出, 4000r/min 离心 2min, 弃去上清液; 沉淀用 70% 冰乙醇洗 2 次, 再用丙酮洗 1 次; 置真空干燥机中干燥。加 TE(pH 8.0) 40 $\mu$ L, 置 56℃水浴 30min, 取出, 8000r/min 离心 2min, 弃去上清液, 置 -20℃保存备用。

**1.3 PAPD 扩增反应及检测** RAPD 扩增反应在 MJ Research 公司生产的 PTC-100<sup>TM</sup> 扩增仪上进行, 凝胶成像系统为 Ultra-Violet Products Ltd. Cambridge UK, DNA Marker 使用宝生物工程(大连)有限公司的 DL2000 其他试剂均购于上海博之鑫公司。反应体系的总体积为 25 $\mu$ L, 包括 1× Buffer, 0.2mmol/L dNTP, 1.5 $\mu$ mol/L 随机引物, 2mmol/L Mg<sup>2+</sup>, DNA 模板 2 $\mu$ L, 1U 的 Taq 酶, 超纯水补至 25 $\mu$ L。扩增程序如下: 94℃ 预变性 6min, 94℃ 变性 1min, 35℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 共 35 个循环。最后 72℃ 延伸 10min, 4℃ 保存 10h, 终止反应。每次反应设空白对照。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu$ g/mL EB)中电泳, 缓冲液为 1× TBE, 电泳时间约 1.5h, 在凝胶成像

系统中进行观察、拍照并分析。

**1.4 数据处理及分析** 根据记录和电泳照片计算清晰的扩增带, 利用 Nei & Li<sup>[10]</sup> 的公式计算遗传距离指数。共享度  $F = 2 \times N_{xy} / (N_x + N_y)$ , 其中  $N_{xy}$  表示样本 x 和 y 之间共有的 DNA 扩增片段数目,  $N_x$  为样本 x 具有的 DNA 扩增片段数目,  $N_y$  为样本 y 具有的 DNA 扩增片段数目。再根据片段共享度来计算遗传距离指数:  $D = 1 - F$ 。将遗传距离指数排成矩阵输入分子进化遗传分析软件 MEGA(version 2.0)程序中, 应用 NJ 法进行聚类分析, 得到 NJ 系统树。根据扩增带, 统计位点总数、多态位点数和每个多态位点在群体中的分布频率, 群体的多态位点百分率  $P = \text{该群体的多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 图谱分析

本研究使用了 A、B、I、S、T 和 K 共 6 个系列 60 个 10bp 随机引物(上海博之鑫公司)。对这些引物进行筛选, 选择其中产生丰富 DNA 扩增片段的 44 个引物正式扩增。筛选的 44 个引物中有 13 个引物扩增出的 RAPD 谱带清晰、重复性好, 具多态性。扩增出的 DNA 条带数目从 2 条到 19 条, 平均每个引物在每个样本上产生 8 条带。表 2 列出了所有 13 个随机引物的序列, 图 1 示引物 S08 和 S11 扩增产物的电泳图。

表 2 13 个随机引物的 DNA 序列和扩增带数

Tab. 2 Sequences and numbers of amplified bands of 13 random primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences	扩增带数 Nos. of bands	引物 Primer	序列(5'-3') Sequences	扩增带数 Nos. of bands
I03	CAGAACCCCA	7—19	S05	TTTGGGGCCT	2—12
I04	CCGCCTAGTC	7—12	S06	GATACCTCGG	2—14
I06	AAGGCCGCAG	2—13	S08	TTCAGGGTGG	7—18
I07	CAGCCACAAG	3—18	S09	TCCTGGTCCC	5—14
I09	TGGAGAGCAG	2—16	S10	ACCGTTCCAG	8—13
I10	ACAAACCGCAG	5—12	S11	AGTCGGGTGG	3—11
I13	CTGGGGCTGA	3—16			

### 2.2 多态性分析与遗传距离指数

13 个引物共检测到 190 个位点, 其中 171 个位点显多态性 多态位点比例(P)为 90%。每个引物均扩增出多态片段, 多态位点百分率因引物而异, 也因克隆而异。表 3 列出了居

群内和居群间遗传距离指数, 平均遗传距离指数为 0.3438。居群内遗传距离指数均小于居群间遗传距离指数, 芜湖居群与广州居群间的遗传距离指数小于芜湖居群与青岛居群的遗传距离指数。

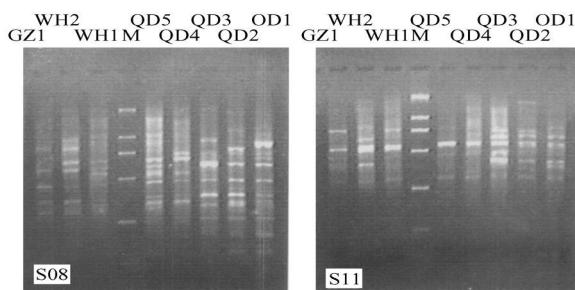


图 1 引物 S08 和 S11 的扩增图谱

Fig. 1 Amplification profiles generated by primers S08 &amp; S11

表 3 居群内和居群间遗传距离指数

Tab. 3 The index of genetic distance between three breeds

居群 Strains	青岛 (QD)	芜湖 (WH)	广州 (GZ)
青岛 (QD)	0.2892		
芜湖 (WH)	0.3683	0.2000	
广州 (GZ)	0.4059	0.3149	0.2830

注: 对角线上的数字为居群内遗传距离, 对角线下方为居群间遗传距离。 Dates on the diagonal represent the genetic distance within strains. Those below the diagonal represent the genetic distance between strains.

### 2.3 聚类分析

对 RAPD 扩增结果进行聚类分析, 基于遗传距离指数构建了角突臂尾轮虫的 NJ 系统树(图 2)。9 个克隆分别聚在 2

个主要簇群中, 克隆 GZ1 和 GZ2 及 WH1 和 WH2 最先聚类, 然后两居群聚成簇群 II; 群体 QD3 和 QD4 先聚类, 再和 QD5 聚类, 然后和 QD1、QD2 聚成簇群 I。

### 3 讨论

已有研究结果表明轮虫地理居群间在形态和生态特征上均存在显著差异。王家楫研究发现采自哈尔滨鱼池及北京北海的角突臂尾轮虫比采自浙江菱湖鱼池及武昌珞珈山东湖的轮虫个体大; Yufera 将个体大小差异显著的褶皱臂尾轮虫居群在实验室培养两年以上后发现其个体大小上的差异仍然存在; Hagiwara 等、Snell 和 Carrillo、席贻龙和胡好远等对褶皱臂尾轮虫、萼花臂尾轮虫 (*B. calyciflorus*) 和角突臂尾轮虫的研究也表明不同居群轮虫在形态和生态特征等方面存在显著差异<sup>[1,2]</sup>。在上述研究的基础上, 相关学者曾推论轮虫形态和生态特征等方面的差异是由于遗传差异造成的。自此之后, Hagiwara 等和 Fu 等通过轮虫等位酶分析以及 Gomez 等通过微卫星 DNA 研究均发现褶皱臂尾轮虫不同地理居群间的确存在着遗传差异<sup>[4]</sup>。本研究中, 在所检测到的 190 个位点中 171 个位点显多态性, 多态位点比例 (P) 为 90%。可见不同地理居群的角突臂尾轮虫遗传变异较大, 遗传多样性也较丰富。RAPD 分析结果表明芜湖和广州居群的角突臂尾轮虫亲缘关系较近, 它们与青岛居群间关系较远; 可见 RAPD 技术可以用于种内居群间分子系统发生关系的研究。

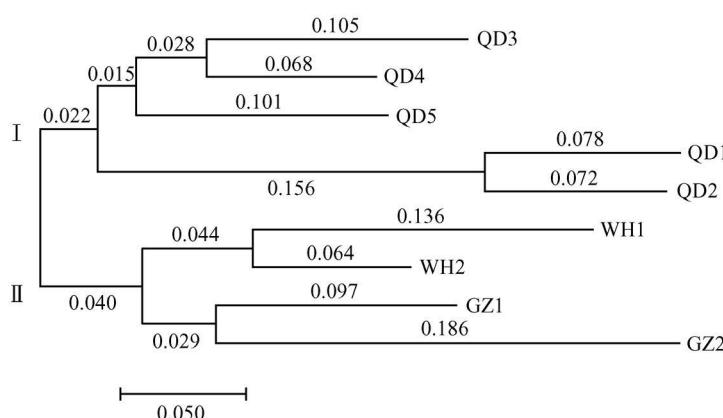


图 2 角突臂尾轮虫克隆群间 NJ 系统树

Fig. 2 NJ dendrogram of the nine clones of *B. angularis*

不同地理居群生物间现有的分布格局可能是由于地质变化、自然地理环境和气候条件差异等导致的<sup>[3,4]</sup>。本研究通过 RAPD 检测发现角突臂尾轮虫居群内遗传距离指数明显小于居群间遗传距离指数, 可见不同地理居群的角突臂尾轮虫间确实存在明显的地理分化特征。从地理分布来看, 三个角突臂尾轮虫地理居群的分布地相距较远, 相互之间的基因交流几乎不可能; 而它们所栖居的自然环境条件差异也较大, 因此可以认为, 它们之间的遗传分化可能是由于长期的区域隔离和长期的自然选择形成的。

### 参考文献:

- [1] Xi Y L, Liu G Y, Jin H J. Population growth, body size and egg size of two different strains of *Brachionus calyciflorus* pallas (rotifer) fed different algae [J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2002, 17(2): 185—190
- [2] Hu H Y, Xi Y L, Geng H. Effects of temperature on life history strategies of three strains of *Brachionus angularis* gosse [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(3): 284—288. 胡好远 席贻龙, 耿红.

温度对三品系角突臂尾轮虫生活史策略的影响. 水生生物学报, 2004, 28(3): 284—288]

[ 3 ] Gomez A, Carvalho G R, Lunt D H. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks[ J ] . *Proc. R. Soc. Lond.*, 2001, 267: 2189—2197

[ 4 ] Gomez A, Adcock G J, Lunt D H. *et al.* The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: microsatellite analysis of rotifer resting egg banks[ J ] . *J. Evol. Biol.*, 2002, 15: 158—171

[ 5 ] Sun Y H, Liu S Y, Peng Z. *et al.* Genetic structure of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) by mtDNA and RAPD markers[ J ] . *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(3): 248—252[ 孙玉华, 刘思阳, 彭智, 等. 中国胭脂鱼种群的遗传分析. 水生生物学报, 2003, 27(3): 248—252]

[ 6 ] Zhu X P, Du H J, Zhou L. *et al.* Genetic diversity analysis of Chi-

nese three-keeled pond turtle (*chinensis raevesi*) by RAPD[ J ] . *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(2): 167—171[ 朱新平, 杜合军, 周莉, 等. 乌龟遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2005, 29(2): 167—171]

[ 7 ] Leutbecher C. A routine method of DNA-extraction from extremely small metazoans, e.g. single rotifer specimens for RAPD-PCR analyses[ J ] . *Hydrobiologia*, 2000, 437: 133—137

[ 8 ] Gibert J J. Mictic female production in rotifer *Brachionus calyciflorus* [ J ] . *J. Exp. Zool.*, 1963, 153: 113—124

[ 9 ] Hao J S, Yang Q, Li X. *et al.* Molecular phylogeny of Cophotrichozoa based on 18s rRNA gene sequences with comment on the phylogenetic position of bryozoa[ J ] . *Journal of genetics and molecular biology*, 2003, 14(2): 64—72

[ 10 ] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[ J ] . *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1979, 76: 5269—5273