

文章编号:1001-5132 (2010) 01-0001-06

浙江省桃花水母遗传多样性的 RAPD 分析

徐善良^{1,2}, 周剑君¹, 王丹丽¹, 孙雪²

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学 海洋生物工程浙江省重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 应用 RAPD 技术对浙江省杭州、宁波、温州和金华 4 个地区桃花水母群体的遗传多样性进行了分析, 从 80 个随机引物中筛选出 10 个引物对 4 个群体 28 个个体的基因组 DNA 进行扩增, 共检测到 230 个位点, 分子片段在 200~2 000 bp 之间, 其中多态位点 124 个, 占 53.91%; 群体间最大的遗传距离为 0.650 6, 最小的遗传距离为 0.245 1, 平均遗传距离为 0.482 5; 各群体的多态位点比例(P)为 27.78%~76.47%, 平均杂合度(H)为 0.099 8~0.297 7, shannon 多样性指数(I)为 0.150 0~0.439 0. 整个群体的 H 、 I 和遗传分化指数(Gst)分别为 0.261 0、0.393 1 和 0.224 9. 研究结果表明: 桃花水母的遗传多样性较丰富, 其中宁波象山和杭州玉泉群体遗传多样性水平低于整体水平, 温州平阳和金华永康群体的遗传多样性水平高于整体水平, 且群体内存在较大的遗传分化.

关键词: 桃花水母; 遗传多样性; RAPD; 浙江省

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

桃花水母隶属于刺胞动物门(Cnidaria), 水螅纲(Hydrozoa), 淡水水母目(Limnomedusae), 笠水母科(Olindiidae), 桃花水母属(*Craspedacusta*), 是腔肠动物中水母类仅有的淡水种类^[1], 为世界珍稀水生生物物种之一. 我国对桃花水母的研究主要停留在对其外形的描述和分类上^[1-2], 近几年也开始对其超微结构、生殖、保护遗传学、实验生态学等方面进行研究^[3-6]; 国外研究相对较深入, 但集中在索氏桃花水母(*Craspedacusta sowerbyi*)上, 对索氏桃花水母的形态结构、生存环境与分布、营养关系和生殖过程等有研究^[7-14]. 目前有关桃花水母的种群遗传多样性研究尚未见报道, 生物丰富的遗传多样性意味着较高的适应生存潜力,

蕴含着较大的进化潜能以及较丰富的育种和遗传改良的潜力, 因此有必要对桃花水母的遗传背景进行研究. 笔者利用 RAPD 技术对浙江省 4 个地区桃花水母群体的遗传多样性进行了分析, 以期了解不同地区桃花水母群体间的遗传差异, 为保护和合理利用桃花水母种质资源提供基础数据.

1 材料与方法

1.1 材料

2007 年 8 月至 2008 年 8 月间采集了杭州玉泉, 宁波象山, 温州平阳和金华永康 4 个地区的桃花水

收稿日期: 2009-10-22.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目(IRT0734); 浙江省自然科学基金(Y307063).

第一作者: 徐善良(1962-), 男, 浙江舟山人, 副研究员, 主要研究方向: 水产动物资源保护. E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn

母(表 1), 采集后固定在 80%的乙醇中.

表 1 桃花水母样品采集

编号	采集日期	采集地
X	2007-10-26	宁波象山市郊一水泥池
Y	2007-08-31	杭州玉泉一消防池
P	2008-05-13	温州平阳水亭水库
YK	2008-07-29	金华永康上黄水库

1.2 基因组 DNA 的提取及检测

每个地区取 7 个桃花水母, 经酒精梯度过渡, 双蒸水清洗数遍后, 用无菌滤纸吸干水分. 加入 TE 缓冲液 100 μ L 后破碎, 再加入 1/10 体积的 10% SDS 和适量的蛋白酶 K, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中消化完全. 再经酚-氯仿抽提、无水乙醇沉淀、70%乙醇漂洗 2 次后, 晾干, 无菌 ddH₂O 充分溶解, 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度, 并保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用.

1.3 引物筛选

采用上海 Sangon 公司 S 系列 80 个引物, 经过 2 轮重复筛选后选出 10 个扩增条带清晰、重复性好的引物(表 2).

1.4 RAPD 扩增反应

采用经过优化的反应体系和条件, PCR 反应在 Tgradient PCR 仪上进行. 反应总体积 25 μ L, 其中 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.15 μ L (TaKaRa 公司), 引物 0.5 μ L, 模板 1.0 μ L, 加无菌 ddH₂O 至 25 μ L. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 45 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将扩增产物在 1.2%的 TAE 琼脂糖凝胶中电泳分离, 凝胶分析仪(GIS-2008)观察并拍照.

1.5 数据采集及处理

参照 Williams 等^[15]的方法, 扩增条带有且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建原始数据表征矩阵, 并据此统计位点总数和多态位点比例, 分析和计算群体的遗传多样性参数. 群体内、群体间的遗传学参数及聚类分析均由软件 PopGen 3.2 完成, 其中: 多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$; 群体平均杂合度 $H = \sum (1 - \sum X_i^2) / n$ (X 为第 i 个等位基因的频率, n 为所测位点总数); Shannon 多样性指数 $I = -\sum P_i \ln P_i$ (P_i 为位点 i 在某一群体中的出现频率); 遗传相似系数 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $D = 1 - S$ (N_x 和 N_y 分别为群体 x 和 y 的位点总数, N_{xy} 为 2 群体间共享位点数, D 为遗传距离); 遗传分化指数 $G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$ (H_t 是群体总杂合度, H_s 是平均群体内杂合度). 以 MPGMA 法构建聚类分析图.

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

筛选出的 10 条 10 bp 寡核苷酸随机引物均得到了重复性好且带型清晰的扩增谱带. 共检测到 230 个位点, 分子片段主要集中在 200~2 000 bp 之间, 其中多态位点 124 个, 占 53.91%. 引物 S96 和 S239 扩增结果见图 1~图 4.

2.2 遗传多样性与聚类分析

2.2.1 多态位点比例、群体平均杂合度和 Shannon 多样性指数

各群体的多态位点数 15~52 个不等, 多态位点的比例为 27.78%~76.47%, 群体平均杂合度为

表 2 随机引物编号及序列

编号	引物	序列	编号	引物	序列
1	S92	CAGCTCACGA	6	S404	GGCGTTGTC
2	S96	AGCGTCCTCC	7	S407	CCGTGACTCA
3	S239	GGGTGTGCAG	8	S406	CTGGGCAACT
4	S315	CAGACAAGCC	9	S413	GGTGGTCAAG
5	S317	GACACGGACC	10	S410	TCTGGCGCAC

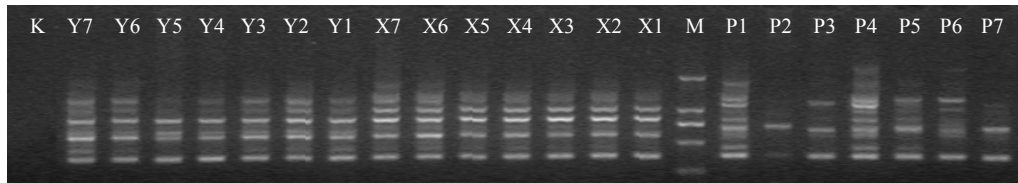


图 1 S96 引物扩增的象山、玉泉和平阳群体

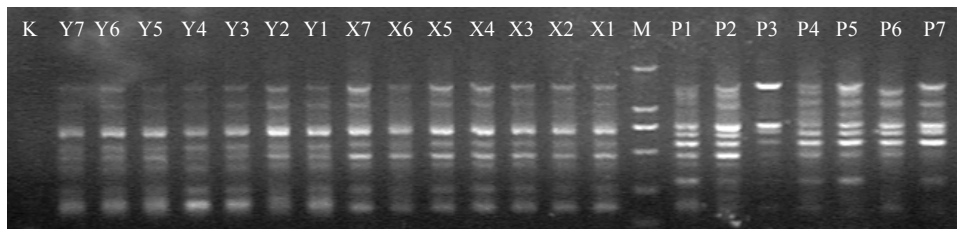


图 2 S239 引物扩增的象山、玉泉和平阳群体

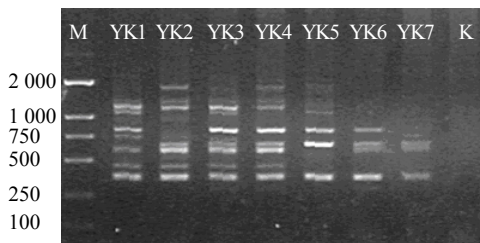


图 3 S96 引物扩增的永康群体

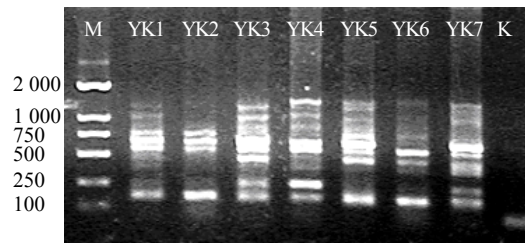


图 4 S239 引物扩增的永康群体

表 3 桃花水母 4 个群体 RAPD 标记分析结果

群体	多态位点数	<i>P</i> %	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
宁波象山	15	27.78	1.277 8	1.166 0	0.099 8	0.150 0
杭州玉泉	21	36.84	1.368 4	1.258 3	0.146 1	0.214 0
温州平阳	52	76.47	1.764 7	1.513 2	0.297 7	0.439 0
金华永康	36	70.59	1.705 9	1.450 4	0.265 7	0.395 0

注: *Na* 表示平均观测等位基因数; *Ne* 表示平均有效等位基因数; *P* 表示多态位点百分率; *H* 表示平均杂合度; *I* 表示 Shannon 多样性指数。

0.099 8~0.297 7, shanon 指数为 0.150 0~0.439 0 (表 3)。多态位点比例和群体平均杂合度以温州平阳群体最高, 金华永康群体次之, 宁波象山群体最低; 以平均遗传杂合度和多态位点比例作为遗传多样性的指标, 可见温州平阳、金华永康群体具有较丰富的遗传多样性。如果将 4 个群体看作一个总的群体, 则总群体的杂合度为 0.261 0, 4 个群体的遗传分化系数为 0.224 9, 可见总群体的遗传变异中有 22.49% 是由不同群体间的差异造成, 77.51% 的遗传分化发生在群体内。

2.2.2 群体间和群体内的遗传相似度和遗传距离

进一步用遗传相似度(*S*)及遗传距离(*D*)分析各群体之间以及各群体内的遗传分化程度, 结果见

表 4。4 个群体两两之间的遗传距离在 0.245 1~0.650 6 之间, 遗传相似度在 0.391 3~0.782 6 之间, 宁波象山群体与杭州玉泉群体之间的遗传距离最小, 遗传相似度最大, 表明两者最为接近, 而这两个群体与金华永康群体相对较远。

从 4 个群体内个体之间的遗传距离和遗传相似度可见, 宁波象山群体内个体之间的遗传距离最小为 0.037 7~0.227 8, 平均为 0.125 1, 遗传相似值最大为 0.796 3~0.963 0, 平均 0.883 6, 表明象山群体内的遗传多样性最低; 杭州玉泉群体次之; 温州平阳群体最高, 遗传距离为 0.249 2~0.785 5, 平均 0.435 7, 遗传相似度为 0.455 9~0.779 4, 平均 0.652 7, 说明该种群内存在

的遗传变异较其他 3 个群体大, 含有较丰富的遗传多样性, 而较高的群体内的遗传多样性说明有较稳定的群体结构.

表 4 4 个桃花水母群体的遗传距离及遗传相似度

群体	平均遗传距离(D)	平均遗传相似度(S)
象山群体/玉泉群体	0.245 1	0.782 6
象山群体/平阳群体	0.362 9	0.695 7
象山群体/永康群体	0.650 6	0.421 7
玉泉群体/平阳群体	0.427 4	0.652 2
玉泉群体/永康群体	0.638 3	0.391 3
平阳群体/永康群体	0.570 5	0.565 2
象山群体的个体之间	0.125 1	0.883 6
玉泉群体的个体之间	0.188 6	0.829 6
平阳群体的个体之间	0.435 7	0.652 7
永康群体的个体之间	0.375 3	0.690 0

2.2.3 聚类分析

通过对 4 个群体的所有个体的聚类分析(图 5), 可看出宁波象山个体先聚为一类, 杭州玉泉个体也聚为一类, 然后宁波象山、杭州玉泉群体和部分温州平阳个体再聚为一类, 剩余的温州平阳个体和少数金华永康个体聚为一类, 这 2 大类再聚为一类, 最后与多数金华永康个体聚为一类. 宁波象山群体与杭州玉泉群体的个体都聚集在各自的群体内, 表明群体内的遗传差异并没有超过群体间的遗传差异程度; 而温州平阳群体和金华永康群体的少数个体未聚集在各自的群体内, 表明群体内存在较大的遗传分化.

3 讨论

遗传多样性是物种适应多变的生存环境而得以维持生存、发展和进化的基础, 是评价生物资源状况的一个重要依据. 多态位点百分率是衡量物种遗传多样性的重要指标之一. 张彦帅等^[16]对黑龙江省强壮水螅(*Hydra robusta*)种群的遗传多样性进行了研究, 结果表明其多态位点比率高达 93.44%, Henry 等^[17]对水螅(*Sertularia cupressina*)进行了

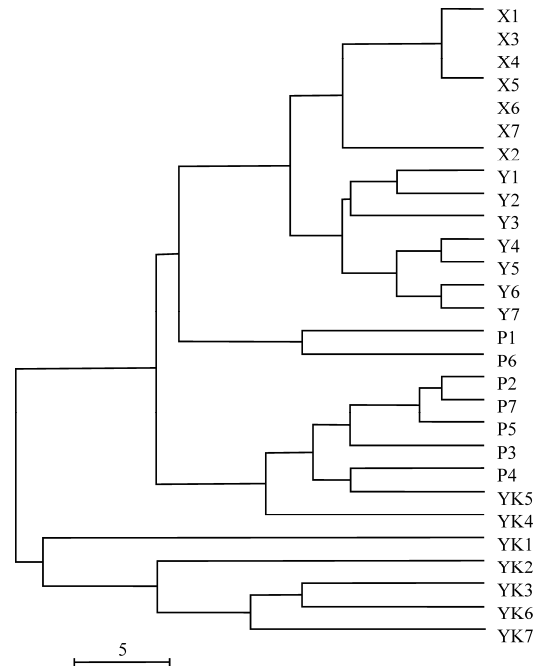


图 5 4 个桃花水母群体的 28 个个体聚类结果

RAPD 研究, 其多态位点比率为 30.9%~71.8%. 因其缺乏与桃花水母相近物种的遗传多样性文献的比较, 我们从其他无脊椎动物相关研究可知, 中国对虾的多态位点比例分别为 36.8% 和 31.07%~34.95%^[18-19]; 日本沼虾的多态位点比例为 21.13%~55.93%^[20]; 太湖秀丽白虾的多态位点比例为 32.94%~38.82%^[21]; 贝类为 41.2%^[22]; 海洋无脊椎动物为 58.7%^[23]. 由此认为, 桃花水母的多态位点比例为 27.78%~76.47%, 其遗传多样性较丰富.

此外, 平均杂合度和多样性指数也可作为衡量遗传多样性的重要指标^[24]. 我们用以上各个参数并结合遗传分化系数和遗传距离作为浙江省桃花水母 4 个群体遗传多样性分析的主要指标. 从整个群体水平上看, 经 RAPD 扩增反应分析得到的 H 、 I 和 G_{st} 分别为 0.261 0、0.393 1 和 0.224 9. 其中宁波象山和杭州玉泉群体的 H 、 I 值均低于整体水平, 所以其遗传多样性水平也低于整体水平; 温州平阳和金华永康群体的 H 和 I 值均高于整体水平, 说明其遗传多样性水平高于整体水平. 4 个群体各自的 P 、 H 及 I 的大小顺序均为: 平阳 > 永康 > 玉泉 > 象山. 根据 P 和 I 来判断各群体的遗传多样性水

平, 结果显示: 温州平阳群体的遗传多样性水平最高, 金华永康群体次之, 杭州平阳群体再次之, 宁波象山群体则相对最低。根据我们对这 4 个群体的形态学和分子生物学观察(见另文), 推测金华永康和温州平阳群体中可能存在 2 个亚种, 因此群体内存在着较大的遗传分化。在 4 个群体之间, 宁波象山群体与杭州玉泉群体之间的遗传距离最小, 遗传相似度最大, 表明两者最为接近, 而这 2 个群体与金华永康群体和温州平阳群体相对较远, 可见遗传距离与实际地理距离和水系有一定的相关性。平阳和永康群体均采集于大型环境优良的水库, 而杭州和象山的群体则采集于消防池和小水池。同一物种某个群体内的遗传距离也反映了该群体的遗传多样性, 数值越大, 该群体遗传多样性丰富程度越高, 温州平阳群体和金华永康群体个体之间的遗传距离相对较大也印证了具有较高的遗传多样性。

研究表明, 由于自然条件变化等因素的影响, 野生种群的遗传结构发生变化或者遗传结构的“纯洁性”会受到污染^[25-26]。由此推断, 尽管当前桃花水母的遗传多样性相对丰富, 但是由于各种人为和环境因素的破坏, 桃花水母群体遗传多样性也有遭受破坏的可能性。从遗传学和进化角度看, 物种的遗传多样性越丰富, 其适应能力、生存能力和进化潜力就越大, 遗传多样性的降低可导致物种退化甚至威胁物种生存。因此, 应当采取适当的措施加强桃花水母资源的保护及合理利用。

参考文献:

- [1] 和振武, 许人和. 中国的淡水水母[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1991.
- [2] 宋大祥, 张超, 吴岷. 桃花水母[J]. 生物学通报, 2002, 37(10):1-3.
- [3] 郑聪霞, 姜乃澄, 胡义波. 索氏桃花水母刺细胞超微结构研究[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2007, 34(4): 455-458.
- [4] 胡义波, 姜乃澄. 浙江两地产索氏桃花水母核糖体小亚基 rRNA 基因序列分析[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2006, 33(5):559-566.
- [5] 王丹丽, 徐善良, 蒋宏雷, 等. 信阳桃花水母对几种生态因子胁迫的耐受反应[J]. 应用生态学报, 2006, 17(4): 1103-1106.
- [6] 徐善良, 蒋宏雷, 王丹丽, 等. 桃花水母的人工培养技术[J]. 水产科学, 2006, 25(9):474-476.
- [7] Thomas Jankowski. The freshwater medusae of the world: A taxonomic and systematic literature study with some remarks on other inland water jellyfish[J]. Hydrobiologia, 2001, 462:91-113.
- [8] McAlpine D F, Peard T L, Fletcher T J, et al. First reports of the freshwater jellyfish *Craspedacusta sowerbyi* (Hydrozoa: Olindiidae) from maritime Canada with a review of Canadian occurrences[J]. J Freshwater Ecol, 2002, 17(2):341-344.
- [9] Harrel R C. New distribution record and ecological notes of the freshwater hydrozoan *Craspedacusta sowerbyi* in southeast Texas[J]. Texas J Sci, 2002(4):357-362.
- [10] Acker T S, Muscat A M. The ecology of *Craspedacusta sowerbyi* Lankester, a freshwater hydrozoan[J]. Am Midl Nat, 1976, 95:323-236.
- [11] Dodson S I, Cooper S D. Trophic relationships of the freshwater jellyfish *Craspedacusta sowerbyi* Lankester[J]. Limnol Oceanogr, 1983, 28(2):345-351.
- [12] Boothroyd I K G, Etheredge M K, Green M K. Spatial distribution, size structure, and prey of *Craspedacusta sowerbyi* Lankester in a shallow New Zealand lake. Hydrobiologia, 2002, 468(1-3):23-32.
- [13] Green J. Plankton associated with medusae of the freshwater jellyfish *Craspedacusta sowerbyi* (Lankater) in a Thames backwater[J]. Freshwater Forum, 1998, 11: 69-76.
- [14] Devries D R. The freshwater jellyfish *Craspedacusta sowerbyi*: A summary of its life history, ecology, and distribution[J]. Journal of Freshwater Ecology, 1992, 7(1): 7-16.
- [15] Williams J, Kubelik R, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [16] 张彦帅, 范学铭. 黑龙江省强壮水螅遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 动物学研究, 2005, 26(2):152-156.
- [17] Henry L A, Kenchington E L R. Ecological and genetic evidence for impaired sexual reproduction and induced

- clonality in the hydroid *Sertularia cupressina* (Cnidaria: Hydrozoa) on commercial scallop grounds in Atlantic Canada[J]. *Marine Biology*, 2004, 145:1 107-1 118.
- [18] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. *海洋学报*, 2004, 28(3):245-249.
- [19] 马春艳, 孔杰, 孟宪红, 等. 中国对虾 5 个地理群体的 RAPD 分析[J]. *水产学报*, 2004, 28(3):245-249.
- [20] 蒋速飞, 傅洪拓, 熊贻伟, 等. 日本沼虾不同地理种群的遗传多样性研究[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(10): 554-558.
- [21] 张敏莹, 徐东坡, 段金荣, 等. 太湖秀丽白虾遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(3):459-462.
- [22] Fujio Y. Genetic variability and heterotic effects within population of aquatic organisms[J]. *Fish Genet Breed Sci*, 1997, 24:43-52.
- [23] Nevo E. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory[J]. *Theoretical Population Biol*, 1978, 13:121-177.
- [24] 钱韦, 葛颂. 居群遗传结构研究中显性标记数据分析方法初探[J]. *遗传学报*, 2001, 28(3):244-255.
- [25] 石拓, 孔杰, 刘萍, 等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析——朝鲜半岛西海岸群体的 DNA 多态性[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(6):609-615.
- [26] 王军, 全成干, 苏永全, 等. 宫井洋大黄鱼遗传多样性的 RAPD 试析[J]. *海洋学报*, 2001, 23(3):87-91.

RAPD Analysis on Genetic Diversity of *Craspedacusta* in Zhejiang

XU Shan-liang^{1,2}, ZHOU Jian-jun¹, WANG Dan-li¹, SUN Xue²

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Samples of *Craspedacusta* are collected from 4 regions in Zhejiang Province including Ningbo, Hangzhou, Jinhua and Wenzhou, and 28 individuals from 4 groups are analyzed by the selection of 10 random primers from the total 80 random primers. Total of 230 RAPD markers are detected in these individuals, and the size of DNA fragments is from 0.2 kb to 2 kb, 124 of 230 markers detected are polymorphic which account for 53.91%. The genetic distance between stocks is found to range from 0.245 1 to 0.650 6, and the average genetic distance to be 0.482 5. The proportion of polymorphic loci (P) is between 27.78%~76.47%, with the average heterozygosity (H) being 0.099 8~0.297 7, and the index of Shannon (I) being 0.150 0~0.439 0. The whole group H , I and Gst are found to be 0.261 0, 0.393 1 and 0.224 9, respectively. The results suggest that the overall genetic *Craspedacusta* is significantly diverse and the level of genetic diversity in Ningbo Xiangshan and Hangzhou Yuquan groups is lower than average. In contrast, Wenzhou Pingyang and Jinhua Yongkang groups turn out to be higher in terms of genetic diversity, indicating that there must be obvious genetic variation in stocks.

Key words: *Craspedacusta*; genetic diversity; RAPD; Zhejiang Province

CLC number: S917.4

Document code: A

(责任编辑 史小丽)