

武汉市湖泊微型裸腹溞种群遗传结构比较分析

胡红娟¹, 黄小龙², 倪加加³, 余育和¹, 吴辰熙¹, 颜庆云¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 武汉中科水生环境工程股份有限公司, 武汉 430071;
3. 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要:分析武汉市9个湖泊中枝角类微型裸腹溞(*Moina micrura*)细胞色素氧化酶亚基I(CO I)基因的多样性情况,对种群遗传多样性进行分析,了解不同地理距离对枝角类种群遗传分化的影响。形态鉴定表明,9个湖泊26个样点中共有8个湖泊17个样点检出微型裸腹溞,牛山湖设置的3个样点均未检测出微型裸腹溞。通过基因测序共得到66条微型裸腹溞CO I基因序列。由CO I基因序列构建的邻接树及Network分析显示,武汉8个湖泊中所得到的微型裸腹溞序列分为3大枝并具有14种不同的单倍体型。曼-惠特尼检验及科尔莫格罗夫-斯米尔诺夫检验均表明,湖泊内和湖泊间的微型裸腹溞遗传距离存在极显著差异。武汉市不同湖泊间微型裸腹溞存在遗传分化倾向。微型裸腹溞CO I基因在选择上是中性的,并且积累了相对较多的突变位点,可以用于种群遗传结构尤其是大尺度上的种群遗传结构分析。

关键词:微型裸腹溞;细胞色素氧化酶亚基I基因;遗传多样性;武汉市湖泊

中图分类号:Q145 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2016)06-0037-05

人类活动不断改变周围的自然环境,也造成了生物种群和群落组成的变化(Hooper et al, 2005)。浮游动物在水体生态系统的生态位中具有重要的作用(Niet al, 2010)。枝角类是浮游动物的重要组成部分,在养殖业和生态系统结构、功能和生物生产力的研究中占有重要地位(章宗涉和黄祥飞, 1991)。目前,枝角类中的溞属已经得到了较为广泛的研究(邓道贵等, 2008; 史文等, 2009),其他种属的研究相对较少(Schwenket al, 1998; Belyaeva & Taylor, 2009)。

枝角类具有表型可塑性,遗传学研究也显示淡水无脊椎动物具有隐藏的多样性(Belyaeva & Taylor, 2009),因此仅靠传统的形态学方法对枝角类进行分类具有一定的局限性(Colbourne et al, 2011)。分子生物学方法为小型生物的生态学研究提供了重要的可选择性(Boenigket al, 2005; Savinet al, 2004)。用分子学方法研究进化历史已经被证明对探究种间和种内进化关系是很有用的方法(Fry & Zink, 1998)。研究表明,长度约为658bp的线粒体CO I基因能够用来作为鉴别动物物种的DNA条形码,这

个基因区域已被证明较容易获得并且具有高的分辨率(Hebert et al, 2003; 产久林等, 2015)。

为检测武汉不同湖泊枝角类的种群遗传多样性,本文以细胞色素氧化酶亚基I(mitochondrial cytochrome oxidase subunit I, CO I)基因为分子标记,通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)、克隆测序对武汉不同湖泊采集的淡水常见浮游动物——微型裸腹溞(*Moina micrura*)种群遗传多样性进行分析,以了解不同地理距离对枝角类种群遗传分化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

样品于2012年7-8月采自武汉市9个湖泊(表1)。根据湖泊的大小每个湖泊设置2~4个样点,样品的采集方法参照《淡水生物研究方法》(章宗涉和黄祥飞, 1991)。

微型裸腹溞样品在ZESS解剖镜(KL 200)下进行形态鉴定。鉴定后,用双蒸水润洗3次,再次置于解剖镜下观察,确定表面无杂质后每只个体分别用20~30 μ L 无菌水保存在2 mL离心管, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2 DNA提取和聚合酶链式反应(PCR)

每个湖泊选取1个或2个样点的微型裸腹溞样品用于测序。微型裸腹溞基因组DNA使用细胞/组织基因组DNA试剂盒(BioTake, 北京百泰克生物技

收稿日期:2015-11-16

基金项目:水体污染控制与治理科技重大专项子课题(2012ZX07104-002-005, 2012ZX07101-007-002)。

作者简介:胡红娟,1987年生,女,助理实验师,研究方向为浮游动物分子生态学。E-mail: huhongjuan@ihb.ac.cn

术有限公司),参照说明书中的组织培养细胞的方法提取。

表1 湖泊及采样点

Tab.1 Information on the nine lakes studied in Wuhan

湖泊	地理位置	湖面面积/ km ²	样点/ 个
牛山湖	30°21'N, 114°32'E	41.7	3
汤逊湖	30°25'N, 114°22'E	33	3
南湖	30°28'N, 114°21'E	7.7	2
武湖	30°46'N, 114°28'E	21.2	3
严西湖	30°34'N, 114°28'E	11.8	3
东湖	30°33'N, 114°23'E	32	4
沙湖	30°33'N, 114°19'E	3.1	2
月湖	30°33'N, 114°14'E	0.7	2
金银湖	30°38'N, 114°12'E	8	4

选用引物 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')/HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al, 1994) 在 S1000™ 热循环仪 (Bio-Rad, 美国) 上扩增微型裸腹蚤 *CO I* 基因。25 μL PCR 反应体系中包含 1 × PCR 缓冲液, 2.0 mM MgCl₂, 0.16 mM dNTP (DBI, 上海), 各 0.12 μM 引物, 1.5 U *Taq* 酶 (Fermentas, 美国) 和 2 μL DNA 模板。扩增反应条件为 95℃ 预变性 3 min; 然后进行 40 个循环的常规 PCR 扩增 (95℃ 变性 1 min, 40℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 1.5 min); 最后 72℃ 延伸 6 min。每个样品平行扩增 2 管。取 5 μL PCR 扩增产物使用 1.2% 的琼脂糖凝胶 100 V 稳压电泳 30 ~ 40 min 检测 PCR 结果。

1.3 DNA 测序

将扩增成功的 2 管平行 PCR 产物混合, 确保每个样品量达到 30 μL 以上。采用引物 LCO1490 单向测通方法进行 DNA 测序, 测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

1.4 数据分析

将测得的序列在 GenBank 数据库中进行 Blastn 比对相似序列和对应物种, 依照系统默认的按最大得分 (max score) 由大到小排列, 位于最前面且 E 值 (E value) 为 0 的 5 条序列都为微型裸腹蚤序列。将确定为微型裸腹蚤的序列运用 ClustalX 2.0.11 进行比对后用于系统进化关系分析。根据比对结果使用 MEGA 4.0 软件以 p-distance 计算序列总体平均距离 (Overall mean distance) 及序列两两间距离 (pairwise distance) 并得出最大遗传距离。运用 MEGA 4.0 软件构建邻接树 (neighbor joining, N-J), 分析不同样点微型裸腹蚤 *CO I* 基因序列的系统进化关系。使用

Network 4.6 构建微型裸腹蚤单倍型网络结构图 (Clement et al, 2000)。

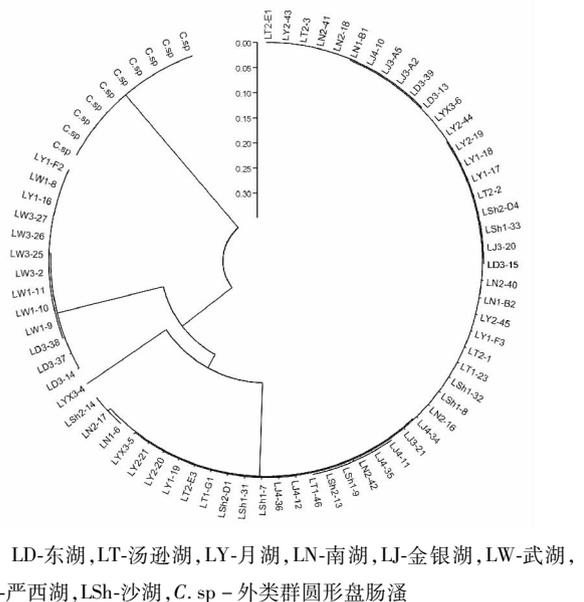
2 结果与分析

2.1 DNA 测序结果

9 个湖泊 26 个样点中共有 8 个湖泊 17 个样点检出微型裸腹蚤, 牛山湖设置的 3 个样点均未检测出微型裸腹蚤。通过测序, 共得 66 条微型裸腹蚤 *CO I* 基因序列, 其中东湖 3 号样点 (LD3) 6 条、严西湖 3 号点 (LYX3) 3 条、金银湖 3 号点 (LJ3) 4 条、金银湖 4 号点 (LJ4) 6 条、南湖 1 号点 (LN1) 3 条、南湖 2 号点 (LN2) 6 条、沙湖 1 号点 (LSh1) 6 条、沙湖 2 号点 (LSh2) 4 条、汤逊湖 1 号点 (LT1) 3 条、汤逊湖 2 号点 (LT2) 5 条、武湖 1 号点 (LW1) 4 条、武湖 3 号点 (LW3) 4 条、月湖 1 号点 (LY1) 6 条、月湖 2 号点 (LY2) 6 条。通过 NCBI 数据库 Blast 比对验证, 所得序列均为微型裸腹蚤的序列。

2.2 微型裸腹蚤种群遗传多样性分析

对所测得 8 个湖中的 66 条微型裸腹蚤 *CO I* 基因序列及东湖的 10 条圆形盘肠蚤 (*Chydorussphaericus*) *CO I* 基因序列构建了邻接树 (图 1)。武湖的全部微型裸腹蚤序列、月湖 1 号点的 2 条序列和东湖 3 号点的 3 条序列聚为一枝, 严西湖 3 号点的 1 条



LD-东湖, LT-汤逊湖, LY-月湖, LN-南湖, LJ-金银湖, LW-武湖, LYX-严西湖, LSh-沙湖, C. sp - 外类群圆形盘肠蚤

图1 根据微型裸腹蚤 (*Moina micrura*) *CO I* 基因序列构建的邻接树

LD-Donghu Lake, LT-Tangxun Lake, LY-Yuehu Lake, LN-Nanhu Lake, LJ-JinYin Lake, LW-Wuhu Lake, LYX-YanXi Lake, LSh-Shahu Lake, C. sp-C. sphaericus

Fig.1 N-J tree based on the *Moina micrura* *CO I* gene DNA sequences

序列单独聚为一枝,除武湖外的其余 7 湖的微型裸腹蚤序列聚为一大枝,东湖的圆形盘肠蚤 (*C. sphaericus*) 作为外类群单独聚为一枝。

2.3 系统发生关系

通过对 66 条微型裸腹蚤 (*Moina micrura*) DNA 序列的 Network 分析得到单倍型结构图 (图 2)。8 个湖泊中的 66 条微型裸腹蚤序列构成 14 种单倍体型,有些不同湖区的微型裸腹蚤具有相同的单倍体型,如东湖、月湖、南湖、金银湖及汤逊湖的部分微型裸腹蚤形成一种单倍体型,东湖、月湖、南湖、金银湖、汤逊湖、严西湖及沙湖的部分微型裸腹蚤形成一种单倍体型等;而有些则单独形成一种单倍体型,如武湖、严西湖的部分微型裸腹蚤。

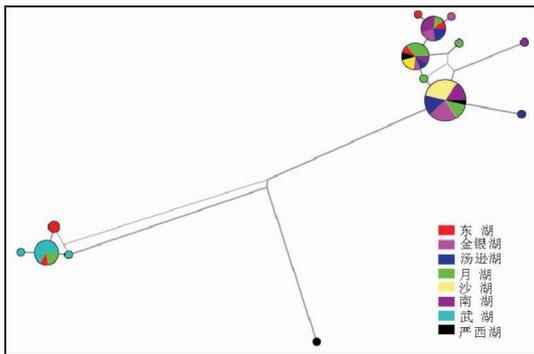


图 2 微型裸腹蚤各群体 CO I 序列单倍型网络结构

Fig. 2 Unrooted parsimony network of CO I sequence haplotypes for *Moina micrura*

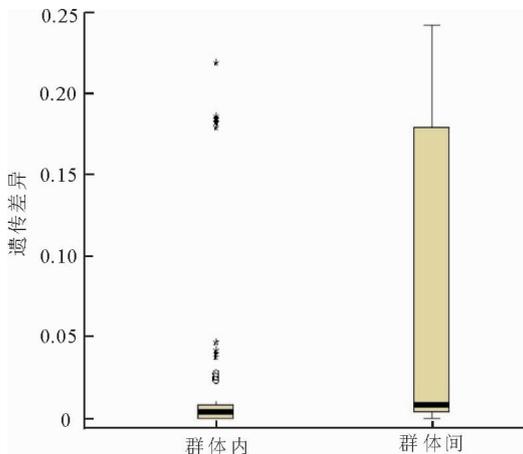


图 3 微型裸腹蚤湖泊内和湖泊间遗传差异

Fig. 3 Box diagram comparing the genetic diversity of *Moina micrura* within-lakes and between-lakes

2.4 微型裸腹蚤湖泊间遗传差异检验

对获得的 8 个湖泊中的 66 条微型裸腹蚤 (*Moina micrura*) DNA 序列进行了曼 - 惠特尼检验 (Mann-Whitney Test), 结果显示微型裸腹蚤在湖泊内和湖泊间遗传关系存在极显著差异

($Z = -8.044$, $P < 0.001$)。同时,进行的双样本科尔莫格罗夫 - 斯米尔诺夫检验 (Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) 结果也显示:微型裸腹蚤在湖泊内和湖泊间遗传关系存在极显著差异 ($Z = 3.997$, $P < 0.001$)。对全序列用 MEGA 4.0 软件以 p-distance 计算得出,序列总体平均距离 (Overall mean distance) 为 0.032,最大遗传距离 0.092。微型裸腹蚤湖泊内和湖泊间遗传差异箱体图 (图 3) 也显示出湖泊内与湖泊间关系存在显著性差异,说明不同湖泊间微型裸腹蚤种群遗传结构存在分化。

3 讨论

地理隔离被广泛认为是物种分化和新物种形成的前提条件,并且有学者发现一些生境的物理特性可以作为扩散的障碍而促进或者维持区域多样性 (Taylor et al, 1998; Cox & Hebert, 2001)。M ventura 等 (2014) 研究庇里牛斯山的长刺蚤 (*Daphnia longispina*) 发现,来自 19 个不同湖泊的长刺蚤线粒体 DNA 多样性相当高,而这些多样性变化的起源可能要追溯到这些湖泊的形成时期。Taylor 等 (1998) 研究发现枝角类洲际间的遗传差异远远大于物种内部的差异。本实验所选枝角类——微型裸腹蚤 (*Moina micrura*) 是淡水浮游动物中常见类群 (章宗涉和黄祥飞, 1991)。枝角类被动扩散能力强,能够覆盖整个甚至多个大洲 (胡红娟等, 2013; 张笑君等, 2014)。本研究结果显示,8 个湖泊的微型裸腹蚤 CO I 基因序列聚类出现分枝,66 条基因序列具有 14 种单倍体型,且统计分析也显示湖泊内与湖泊间遗传差异极显著,说明不同湖泊间的地理隔离使不同湖泊中的微型裸腹蚤产生显著遗传差异,表明不同湖泊间微型裸腹蚤的遗传结构出现了分化,支持了 Taylor 等人的研究成果。

对于遗传变异的保持机制目前尚存在很多争论,大多数学者认为遗传变异是适应环境变化的必需行为 (Ayala, 1982)。对广布种的种群遗传结构研究;发现广布种的种群遗传结构存在种群的遗传隔离和潜在的种的分化 (Zeyl, 1993)。达尔文加拉帕戈斯鸟的例子表明即使具有高度扩散的能力,在短距离的岛屿之间仍然可以形成不同的物种谱系 (De Meester et al, 2002)。由于淡水生物 (大部分是无脊椎动物) 本身具有相对陆生物种更低的突变率 (De Meester et al, 2002), 迁移可以促进水生种类在广阔地理距离间的统一。内陆水体通常是相互隔离的,为验证岛屿栖息地理论提供了很好的例子。由此可

以推测,由于不同水体之间的物种无法进行基因交流而且不同湖区的环境逐渐不同,分布在不同水体中的同种生物逐渐适应所处环境而产生遗传分化。

构建的邻接树显示武汉武湖的全部微型裸腹蚤序列仅与月湖及东湖的少量序列聚为一枝,而未与其余7个湖泊的绝大部分序列聚为一枝,可见武湖样点的微型裸腹蚤种群存在的遗传变异较大。武湖在地理位置上距离其他7个湖泊相对较远,说明地理距离可能会造成微型裸腹蚤种群遗传结构改变。Belyaeva & Taylor (2009) 关于圆形盘肠蚤的研究表明不同区域的圆形盘肠蚤序列分别聚为不同的进化枝,说明圆形盘肠蚤在较大地理范围内具有区域特异性。月湖1号点的2条序列和东湖3号点的3条序列与武湖样点序列聚为一枝,这可能是由于枝角类具有较强的被动扩散能力,武湖、月湖及东湖与长江较近,在未与长江隔离前,水体内枝角类因被动扩散而存在一定的基因交流。

参考文献

产久林,姜华鹏,刘一萌,等, 2015. *CO I* 和 16 *SrRNA* 基因在高原裂腹鱼物种鉴定中的应用[J]. 水生态学杂志, 36(4): 98 - 104.

邓道贵,孟琼,殷四涛,等, 2008. 温度和食物浓度对大型蚤 *Daphnia Magana* 种群动态和两性生殖的影响[J]. 生态学报, 28(9): 4268 - 4276.

胡红娟,颜庆云,倪加加,等, 2013. 武汉东湖圆形盘肠蚤种群遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 37(6): 1007 - 1012.

史文,刘其根,吴晶,等, 2009. 不同藻类对大型蚤存活和生殖的影响[J]. 生态学杂志, 28(6): 1128 - 1133.

章宗涉,黄祥飞, 1991. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社: 288 - 297.

张笑君,韩博平,林秋奇, 2014. 2座级联调水型水库枝角类的季节动态特征[J]. 水生态学杂志, 35(1): 7 - 12.

Ayala F J, 1982. Population and evolutionary genetics: a primer [M]. Menlo Park: Benjamin/ Cummings.

Belyaeva M, Taylor D J, 2009. Cryptic species within the *Chydorusphaericus* species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 50(3): 534 - 546.

Boenigk J, Pfandl K, Stadler P, et al, 2005. High diversity of the "Spumella-like" flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions [J]. Environmental Microbiology, 7(5): 685 - 697.

Clement M, Posada D, Crandall K A, 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. Molecular Ecology, 9(10): 1657 - 1659.

Colbourne J K, Pfrender M E, Gilbert D, et al, 2011. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex* [J]. Science, 331(6017): 555 - 561.

Cox A J, Hebert P D, 2001. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean [J]. Molecular Ecology, 10(2): 371 - 386.

De Meester L, Gomez A, Okamura B, et al, 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms [J]. Acta Oecologica, 23(3): 121 - 135.

Fry A J, Zink R M, 1998. Geographic analysis of nucleotide diversity and song sparrow (Aves: Emberizidae) population history [J]. Molecular Ecology, 7(10): 1303 - 1313.

Hebert P D N, Cywinski A, Ball S L, et al, 2003. Biological identification through DNA barcodes [J]. Proceeding of the Royal Society B-Biological Sciences, 270(1512): 313 - 321.

Hooper D U, Chapin F S, Ewel J J, et al, 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge [J]. Ecological Monographs, 75(1): 3 - 35.

M ventura, A petrusek, A miro, et al, 2014. Local and regional founder effects in lake zooplankton persist after thousands of years despite high dispersal potential [J]. Molecular Ecology, 23: 1014 - 1027.

Ni J J, Yu Y H, Feng W S, et al, 2010. Impacts of algal blooms removal by chitosan-modified soils on zooplankton community in Taihu Lake, China [J]. Journal of Environmental Sciences, 22(10): 1500 - 1507.

Savin M C, Martin J L, Le Gresley M, et al, 2004. Plankton diversity in the bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods [J]. Microbial Ecology, 48(1): 51 - 65.

Schwenk K, Sand A, Boersma M, et al, 1998. Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera [J]. Aquatic Ecology, 32(1): 37 - 51.

Taylor D J, Finston T L, Hebert P D N, 1998. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: pseudo congruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex [J]. Evolution, 52(6): 1648 - 1670.

Zeyl C, 1993. Allozyme variation and divergence among populations of *Rana sylvatica* [J]. Journal of Herpetology, 27(2): 233 - 236.

Genetic Structure of *Moina micrura* Populations in Wuhan Lakes

HU Hong-juan¹, HUANG Xiao-long², NI Jia-jia³, YU Yu-he¹, WU Chen-xi¹, YAN Qing-yun¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China;

2. Wuhan ZhongKe Hydrobiology Environmental Engineering Co. LTD, Wuhan 430072, P. R. China;

3. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial

Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong

Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, P. R. China)

Abstract: The environment is changing continuously due to human activities and this is causing changes in the biota and community composition. The diversity of a single gene, mitochondrial cytochrome *c*-oxidase subunit 1 (*CO I*) of *Moina micrura* (*M. micrura*), from nine lakes in Wuhan was analyzed to evaluate the impact of human activities on the genetic diversity of zooplankton in urban Lakes. In July and August of 2012, *M. micrura* sampling was carried out at 26 sites in nine lakes within Wuhan City: Donghu Lake, Tangxun Lake, Yuehu Lake, Nanhu Lake, Jinyin Lake, Wuhu Lake, Yanxi Lake, Shahu Lake and Niushan Lake. *M. micrura* were observed at 17 of the sampling sites in eight lakes using morphological identification (*M. micrura* was not detected in Niushan Lake). A total of 66 different *CO I* gene sequences in *M. micrura* were obtained by gene sequencing and each was confirmed as *M. micrura* by comparison with the Gen Bank database. N-J tree of the 66 *CO I* gene sequences and ten *CO I* gene sequences for *Chydorussphaericus* in Donghu Lake were constructed using the neighbor joining (N-J) method. N-J tree shows that the *CO I* gene sequences of *M. micrura* from 8 lakes clustered into 3 clades, while the 10 *CO I* gene sequences of *Chydorussphaericus* in Donghu Lake clustered into one clade. The unrooted parsimony network suggests that there are 14 haplotypes of *M. micrura* in the eight lakes. Both the Mann-Whitney Test ($Z = -8.044$, $P < 0.001$) and Kolmogorov-Smirnov Test ($Z = -8.044$, $P < 0.001$) indicate that there is a highly significant difference in the genetic distance of *M. micrura* populations within-lakes compared to those between-lakes, with an overall mean distance of 0.032 and a maximum genetic distance of 0.092. A box diagram of *M. micrura* genetic diversity also indicates a significant difference in the genetic distance of *M. micrura* within-lakes compared to between-lakes. In conclusion, obvious genetic differences exist among the *M. micrura* populations from different lakes in Wuhan City. Inland water bodies are normally isolated from one other and we postulate that *M. micrura* populations from different lakes gradually diverge due to lack of gene exchange and adaptation to different lake environments. The *CO I* gene of *M. micrura* can be used for analyzing population genetic structure, particularly the large scale structure.

Key words: *Moina micrura*; *CO I* gene; genetic diversity; Wuhan lakes