

东湖天蓝喇叭虫 (*Stentor coeruleus*) 种群的离散分化*

刘志新^{1,2}, 龚迎春^{1,2}, 王爱芹^{1,2}, 王启烁^{1,2}, 余育和^{1**}, 冯伟松

(1: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用筛选的 12 条 10 bp 的随机引物对采自武汉市东湖(3 个样点)、南湖(3 个样点)、月湖(1 个样点)和关桥(1 个样点)四个水体的天蓝喇叭虫 (*Stentor coeruleus*) 种群进行了随机扩增多态 DNA (RAPD) 研究, 所得清晰条带显示不同样点样本之间存在着一定的变异, 其遗传距离在 0.076–0.416 之间. 用 Rapdistance 1.04 构建聚类图并探讨不同样点之间的遗传距离远近. 结果显示南湖的 3 样点的遗传距离较近, 在聚类图上聚成一枝, 应该为同一个种群; 而东湖的 3 个样点可能是由于地理隔离原因, 在聚类图上有 2 个样点聚成一枝, 而另 1 个样点被其他样点所分隔, 不属于同一个种群. 这种现象的发现从实例上支持了生物地理学关于物种形成的离散假说. 更有意义的是本研究可启动水体微生物种群分化和物种形成及过渡的研究, 并期望促进种群生态学方面的研究和谱系生物地理学及离散分化生物地理学的发展.

关键词: RAPD; 天蓝喇叭虫; 种群; 离散假说; 东湖

The population vicariance of *Stentor coeruleus* in Lake Donghu, Wuhan

LIU Zhixin^{1,2}, GONG Yingchun^{1,2}, WANG Aiqin^{1,2}, WANG Qishuo^{1,2}, YU Yuhe^{1**} & FENG Weisong¹

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

(2: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, P. R. China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were applied to analyze genetic relationships of *Stentor coeruleus* that were sampled from four water areas including Lake Donghu (D. Lake), Lake Nanhu (N. Lake), Lake Yuehu (Y. Lake) and Pond Guanqiao (G. Pond). Their Genomes were amplified with 12 random primers. Distinctly different banding patterns were obtained, with which the genetic relationship of organisms treated was deduced; the genetic distance among the sample was 0.076–0.416. The phylogenetic tree was constructed by Rapdistance 1.04. The results showed that three samples from N. Lake clustered into one branch which indicated *S. coeruleus* in the lake belong to one population, but 3 samples from D. Lake were separated by the sample from G. Pond which showed that *S. coeruleus* in it belong to different populations. This discovery supported the hypothesis of vicariance in geographic. It will promote the researches on the population ecology of micro-hydrobiont, and the development of phylogeography and vicariance biogeography.

Keywords: Random amplified polymorphic DNA (RAPD); *Stentor coeruleus*; population; vicariance; Lake Donghu (Wuhan)

天蓝喇叭虫 (*Stentor coeruleus*) 是纤毛门 (Ciliophora Doffein, 1901) 多膜纲 (Polymenophorea Jankowski, 1967) 异毛目 (Heterotrichida Stein, 1859) 喇叭科 (Stentoridae Carus, 1863) 喇叭虫属 (*Stentor* Oken, 1815) 的一种常见种类, 世界性分布. 天蓝喇叭虫伸展时体长可达 1–2 mm, 易于采集和培养, 而且由于其繁殖快, 分布广^[1,2], 相对进化速度快, 是研究种群分化的良好材料. 但是, 到目前为止国内外对于天蓝喇叭虫 (*S. coeruleus*) 等纤毛虫的研究大多局限在形态学, 分类学^[3,4] 等方面, 而在生物地理方面的应用研究甚少.

* 国家自然科学基金 (30490232)、淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题 (2005FB13) 联合资助. 2006–06–06 收稿; 2006–07–31 收修修改稿. 刘志新, 男, 硕士研究生; E-mail: lzx20022456@126.com.

** 通讯作者: E-mail: yhyu@ihb.ac.cn.

由于生物的分布有其特定的时间和空间特征,而且与地理因素息息相关,人们对生物地理现象的关注由来已久^[5]. 生物地理学是研究生物的分布及其规律的科学,研究的领域涉及物种的起源、扩散、分化和分布. 生物地理学的核心问题是要解决现存物种是如何起源的,其分布模式是如何形成的,以及为什么会存在特有种和物种间断分布的现象^[6]. 在新物种形成的过程中种群的分化是第一步,但是关于种群分化最终导致物种的形成及其分布,目前人们尚未形成统一的观念. 在生物地理学中关于种群分化最终导致物种的形成及其分布目前存在着离散说(vicariance)和扩散说(dispersal)两种假说^[7].

自 Rosen 在 1976 年首次将泛生物地理学(panbiogeography)和支序系统学结合建立了离散分化生物地理学(vicariance biogeography)以来^[8],生物地理学在本世纪最重要的发展是离散说(vicariance)的广泛提倡^[9]. 而在中国,这方面的研究并没有受到应有的重视. 迄今为止,离散说(vicariance)理论和方法的研究实例依然很少^[5]. 最近十年来分子手段广泛应用于生物地理学研究的各个方面,尤其是谱系生物地理学(phylogeography)^[10]的快速崛起是生物地理学的一个明显特征. 随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析技术因其有操作简单、灵敏度高和具有丰富的引物供筛选等特点而常被视作近缘种间及种内区分和系统关系分析的重要分子手段^[11]. 本文试图利用此种分子标记技术对武汉 4 个水体的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)进行种群遗传多样性和遗传结构的分析,为种群分化和物种形成提供理论依据和研究方法,并期望能够促进天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)等纤毛虫在生物地理学方面的研究应用.

1 材料与方法

1.1 实验材料的采集与处理

研究所用天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)采自武汉东湖(D. Lake)、南湖(N. Lake)、月湖(Y. Lake)、关桥(G. Pond)4 个水体. 其中东湖(D. Lake)设 D. Lake I、D. Lake II 和 D. Lake III 3 个采样点,南湖设 N. Lake I、N. Lake II 和 N. Lake III 3 个采样点,作为参考系的月湖和关桥各设一个采样点(图 1). 采集的样本在解剖镜下用微吸管逐个挑出后用蒸馏水清洗以去除杂质和其他的微生物,室温下在蒸馏水中饥饿 24 h 以消化虫体内的食物,再次收集虫体,无菌水洗涤三次.

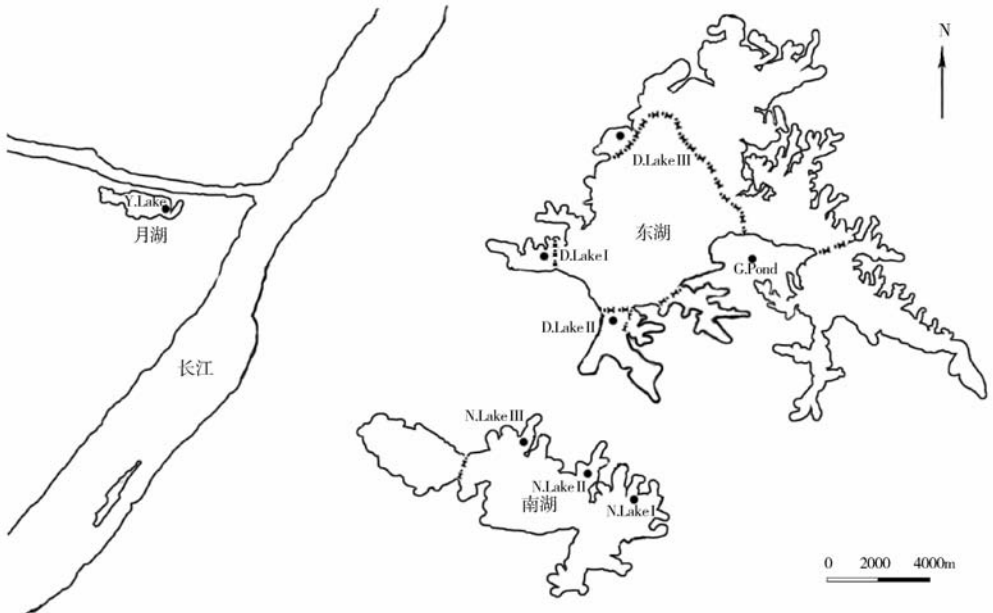


图 1 8 个采样点的分布(---型线表示湖中填湖修建的公路)

Fig. 1 Eight sampling locations (the line of --- show roads in the lake)

1.2 DNA 的提取

洗净收集 200 - 300 个虫体,加适量的消化液(0.1M EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.5% SDS; 60 μg/ml Proteinase K)于 55℃ 过夜 8 - 12 h, 然后按传统的酚/氯仿法提取总 DNA, TE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)溶解后于 4℃ 保存备用.

1.3 引物筛选

本实验共对 98 条 10 bp 的引物进行筛选,引物均从 Operon 公司购买. 用关桥样本所提的总 DNA 进行初筛,从 98 条引物中筛出 45 条多态性好且清晰稳定条带的引物. 然后换用南湖样本所提的总 DNA 从筛选出的 45 条引物中进一步筛选出 12 条多态性好且效果稳定的引物用于本实验 8 个样本的 DNA 扩增. 引物号及序列见表 1.

表 1 随机引物及序列
Tab. 1 List of sequence of arbitrary primers

引物号	序列(5' - 3')	引物号	序列(5' - 3')
E - 04	gtgacatgcc	1 - 14	tgacggcggt
E - 07	agatgcagcc	1 - 18	tgcccagcct
E - 15	acgcacaacc	V - 01	tgacgcatgg
E - 16	ggtgactgtg	V - 10	ggacctgetg
G - 08	tcactccac	V - 12	acccccact
1 - 12	agagggcaca	BA - 07	gggtcgcac

1.4 RAPD 扩增

反应体系为 25 μl,其中模板 DNA 20 - 25 μg/ml,10 × buffer 2.5 μl, Mg²⁺ 2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1U, dNTP 0.2 mmol/L, 引物 0.4 μmol/L. 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s, 36℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min,45 个循环;72℃ 延伸 10 min.

1.5 电泳检测

扩增产物用含有 EB(0.5 μl/ml)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,电泳液为 0.5 × TBE,取样品 DNA 10 μl 加 2 μl 溴酚蓝染色,混匀后点入胶孔. 75V 恒压电泳 1.5 h,Image UVP 凝胶处理系统观察并一次性成像.

1.6 数据分析

根据 200 bp DNA Ladder(MBI)指示的标准分子量,对照反应产物在琼脂糖凝胶上的迁移率,依据统一标准确定片段大小,分别用 1 和 0 代表扩增位点的有无,采用专业软件 Rapdistance1.04 进行 Neighbor-joining 聚类分析.

2 结果

采用 12 条随机引物,对东湖、南湖等 4 个水体采集的 8 个样本进行 PCR 扩增,共获得 89 条大小为 100 - 1500 bp 的清晰条带,平均每条引物扩增出 7.4 条片段. 扩增出来的片段显示出较大的多态性.

采用软件 Rapdistance 1.04 根据 Nei & Li 遗传距离分析法^[12]对扩增结果进行统计并计算遗传距离并进行聚类分析,聚类分析结果显示如下(图 2,图 3).

东湖的的 3 个样点 D. Lake I, D. Lake II, D. Lake III 与另外两个水体关桥,月湖的遗传距离中(表 2), D. Lake III 与 Y. Lake 的遗传距离最近,为 0.140625. D. Lake III 与处在同一个水体中的样点 D. Lake I, D. Lake II 的遗传距则分别为 0.276637, 0.314286. 在构建的聚类图上(图 2) D. Lake I 和 D. Lake II 聚在一起, D. Lake III 和 Y. Lake I 聚在一起,东湖(D. Lake)水体中的三个样点 D. Lake I, D. Lake II, D. Lake III 在聚类图上被关桥所分隔开. 这个结果显示生活在同一水域——东湖中的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)不是一个种群.

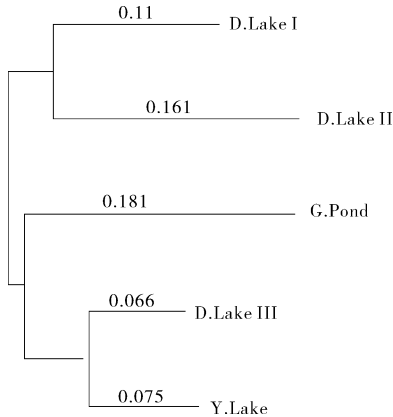


图2 采用邻接法, Nei 遗传距离分析
12 条引物得到的 5 个样点
(东湖(D. Lake)3 个, 月湖(Y. Lake)和
关桥(G. Pond)各 1 个)的聚类图

Fig. 2 Neighbor-join dendrogram of five assemblages
(3 from D. Lake, 1 from G. Pond and 1 from Y. Lake)
based on Nei's genetic distance using 12 primers

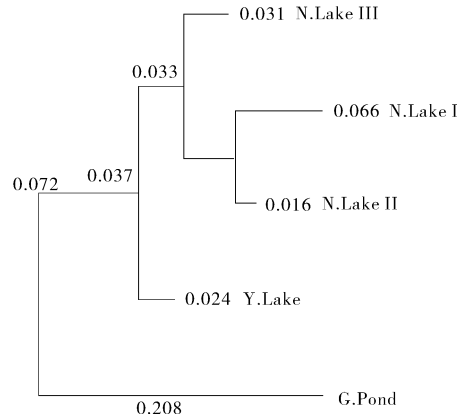


图3 采用邻接法, Nei 遗传距离分析
12 条引物得到的 5 个样点
(南湖(N. Lake)3 个, 月湖(Y. Lake)和
关桥(G. Pond)各 1 个)的聚类图

Fig. 3 Neighbor-join dendrogram of five assemblages
(3 from N. Lake, 1 from G. Pond and 1 from Y. Lake)
based on Nei's genetic distance using 12 primers

表2 Nei 遗传指数分析东湖(D. Lake), 关桥(G. Pond)和月湖(Y. Lake)三样点之间的遗传距离(D)矩阵
Tab. 2 Genetic distance with Nei's coefficient of D. Lake, G. Pond and Y. Lake

	D. Lake I	D. Lake II	D. Lake III	G. Pond	Y. Lake
D. Lake I	0.0				
D. Lake II	0.270833	0.0			
D. Lake III	0.276637	0.314286	0.0		
G. Pond	0.340000	0.369565	0.284404	0.0	
Y. Lake	0.283697	0.333333	0.140625	0.304348	0.0

南湖的 3 个样点 N. Lake I, N. Lake II, N. Lake III 与另外两个水体关桥, 月湖的遗传距离中(表 3), N. Lake II 与 N. Lake III 的遗传距离最近, 为 0.075862。其次为 N. Lake I 和 N. Lake II, 两者之间的遗传距离为 0.081481。在聚类图上(图 3) N. Lake II 和 N. Lake III 首先聚在一起, 然后与 N. Lake I 聚在一起形成一个分支。关桥样点独立形成一个分支。这个结果显示生活在同一水域——南湖中的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)为一个种群。

表3 Nei 遗传指数分析南湖(N. Lake), 关桥(G. Pond)和月湖(Y. Lake)三样点之间的遗传距离(D)矩阵
Tab. 3 Genetic distance with Nei's coefficient of N. Lake, G. Pond and Y. Lake

	N. Lake I	N. Lake II	N. Lake III	G. Pond	Y. Lake
N. Lake I	0.0				
N. Lake II	0.081481	0.0			
N. Lake III	0.142857	0.075862	0.0		
G. Pond	0.415929	0.389831	0.332343	0.0	
Y. Lake	0.151515	0.094891	0.098592	0.304348	0.0

为了验证实验结果的可靠性,采用同样的数据,用软件 Rapdistance1.04 根据 Jaccard 遗传距离分析法^[13]对扩增结果进行统计并构建聚类图,进一步确认结果(图4,图5). 所得的结果和上述结果吻合.

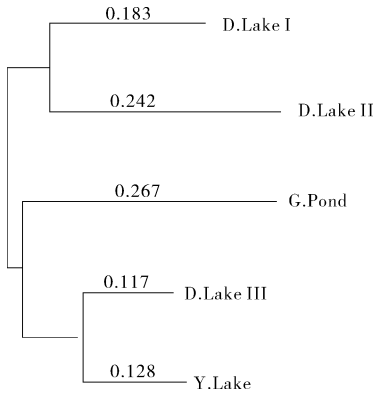


图4 采用邻接法, Jaccard 遗传距离分析 12 条引物得到的 5 个样点 (东湖(D. Lake)3 个, 月湖(Y. Lake)和 关桥(G. Pond)各 1 个)的聚类图

Fig. 4 Neighbor-join dendrogram of five assemblages (3 from D. Lake, 1 from G. Pond and 1 from Y. Lake) based on Jaccard's genetic distance using 12 primers

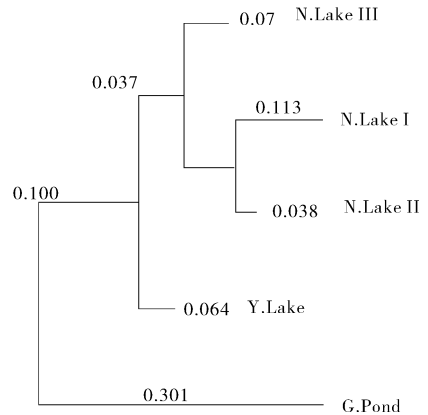


图5 采用邻接法, Jaccard 遗传距离分析 12 条引物得到的 5 个样点 (南湖(N. Lake)3 个, 月湖(Y. Lake)和 关桥(G. Pond)各 1 个)的聚类图

Fig. 5 Neighbor-join dendrogram of five assemblages (3 from N. Lake, 1 from G. Pond and 1 from Y. Lake) based on Jaccard's genetic distance using 12 primers

3 讨论

种群分化和物种的形成历来存在离散说(vicariance)和扩散说(dispersal)两种假说之争. 离散说(vicariance)指因地理障碍(geographic barrier)的形成而使原本分布不连续的生物种群被隔离开,从而逐渐发生异域物种形成而产生的生物地理格局^[14]. 扩散说(dispersal)则认为地理障碍(geographic barrier)是早就存在的,生物后来越过障碍形成零星分布,再进一步独立演化^[9,15]. 两种假说的最大区别在于地理障碍是出现在扩散之前还是出现在扩散之后^[16].

离散(vicariance)事件是指任何使原来连续分布的生物种群产生不连贯分布的事件(可能是地质、气候或其它事件). 通常被包括在离散说(vicariance)学派里面的主要的、有较大影响的历史生物地理学研究领域有泛生物地理学(panbiogeography)^[17,18]、第四纪森林避难所理论^[17]、地区特有性的简约性分析^[19,20]以及分支生物地理学(cladistic biogeography)^[21]. 对离散说(vicariance)学派生物地理学来说,离散(vicariance)现象是解释所涉及的生物群的各分类单元之间的分支发生关系与这些生物所处的分布区之间历史关系的首要因素. 一次离散(vicariance)事件被假定为会导致在涉及地区的所有单系种群产生物种分化. 由此地区的历史与生物群的分化历史得以联系起来^[22].

本试验对东湖(D. Lake)等 4 个水体的分析可得出以下两点:一,在对南湖(N. Lake)内的 3 个样点的分析中,结果支持同一水体天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)属于同一个种群;二,在东湖(D. Lake)内的 3 个样点的分析中,结果支持同一水体天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)不是一个种群. 从南湖(N. Lake)的分析结果看,同一水体中的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)应属于同一个种群,东湖之中的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)之所以产生种群分化可能是由于湖体被分割所造成的离散(vicariance). 东湖和南湖本来都是连续的水体,但是东湖在 20 世纪 50 年代左右由于填湖修建了湖中公路等建筑,湖体形成了一定程度的隔离,不同的湖区之间仅有若干个桥孔相连,水体间的互相流动十分有限,本次试验在东湖的 3 个采集点也都处在不同的湖区之内,而作为参照的南湖 3 个样点仍处在连续的水体中. 作为两个较大的湖泊,东湖和南湖的天蓝喇叭虫(*S. coer-*

uleus) 种群都在不断的扩散和分化之中,但是南湖中的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)并没有为此而产生种群的分化,而东湖的却分化为多个种群. 由此可以推断东湖内的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)原本为同一个种群,后来由于在湖中建桥修路(图 1)等原因在一定程度上造成了湖中不同区域的地理阻隔,从而进一步造成了种群的分化. 这在实例上对离散说(vicariance)作出了有力的支持.

由于原生动物生命周期短,繁殖快等特点,在相对短的时间内可以获得更多的变异,在进化速率上要比大型动物快. 而且,作为一种微型单细胞生物,其纤薄的细胞膜直接与外界环境相接触,对环境的变化更为敏感. 本文采用的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)是一种营自由生活的世界性分布的原生动物,采用其作为研究种群分化的模式生物,对于研究微型生物的起源和种群分化等生物地理学的研究具有事半功倍的作用.

值得我们进一步思考的是,造成东湖中的天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)种群分化的是否还有其他的原因呢? 譬如,湖中不同的区域的湖水理化因子的差异. 这是本研究要进一步证实的问题.

4 参考文献

- [1] Tartar V. *The Biology of Stentor*. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1961.
- [2] 沈韞芬主编. 原动物学. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 顾福康主编. 原动物学概论. 北京: 高等教育出版社, 1991.
- [4] Kudo R R. *Protozoology*. 15th ed. Illinois Thomas Springfield, 1971: 968 - 970.
- [5] 杨任之译注. 尚书禹贡篇. 北京: 北京广播学院出版社, 1993: 46 - 68.
- [6] 陈 领, 宋延龄. 生物地理学理论的发展. *动物学杂志*, 2005, **40**(4): 111 - 120.
- [7] Ronquist F. Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst Biol*, 1997, **46**: 195 - 203.
- [8] Donn E Rosen. Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Systematic Zoology*, 1978, **27**: 159 - 188.
- [9] Cox C B, Moore P D. *Biogeography: an ecological and evolutionary approach*. 5th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1993.
- [10] Avise J C. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [11] 王爱芹, 余育和, 张文静. 东湖螳状独缩虫(纤毛门: 寡膜纲)的异质性. *生态学报*, 2006, **26**(3): 895 - 900.
- [12] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 5269 - 5273.
- [13] Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat*, 1908, **44**: 223 - 270.
- [14] Briggs J C. *Global Biogeography*. Amsterdam: Elsevier, 1995: 1 - 452.
- [15] David M Wilkinson. Dispersal, cladistics and the nature of biogeography. *Journal of Biogeography*, 2003, **30**: 1779 - 1790.
- [16] 陈宜瑜, 刘焕章. 生物地理学的新进展. *生物学通报*, 1995, **30**(6): 1 - 4.
- [17] Croizat L. *Space, time, form: the biological synthesis*. Caracas: Published by the author, 1964.
- [18] Hafer J. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 1969, **165**: 131 - 137.
- [19] Rosen B R. Long-term geographical controls on regional diversity. *Open Univ Geological Soc J*, 1985, **6**: 25 - 30.
- [20] Rosen B, Smith A B. Tectonics from fossils? Analysis of reef coral and sea urchin distributions from late Cretaceous to Recent, using a new method. In: Audley-Charles M G, Hallam A ed. *Gondwana and Tethys*. London: *Geol Soc Lond Spec. Publ*, 1988.
- [21] Humphries C J, Parenti L R. *Cladistic Biogeography*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999: 1 - 98.
- [22] Van Veller M G P, Zandee M, Kornet D J. Two requirements for obtaining valid common patterns under different assumptions in vicariance biogeography. *Cladistics*, 1999, **15**(4): 393 - 406.