

利用 RAPD 标记研究几种淡水腹足类的亲缘关系*

潘宝平^① 杨毅^②

(^①南开大学生命科学学院 天津 300071; ^②天津医科大学附属肿瘤医院 天津 300060)

摘要: 以软体动物腹足纲、中腹足目的光滑狭口螺、长角涵螺、纹沼螺、赤豆螺、大沼螺几个形态分类的近缘种及梨形环棱螺(对照)作为研究对象,用随机扩增多态 DNA 技术对上述动物进行了 20 个引物的扩增,共获得 117 条扩增谱带,单个引物扩增的 RAPD 标记在 3~12 个之间,片段长度在 340~3 000 bp 之间。试验结果显示:淡水螺类的 RAPD 标记具有明显的多态性,而且种间的扩增标记及差异程度可以反映出物种间系统演化过程的亲缘关系。通过数值聚类制图后得到:长角涵螺、纹沼螺、大沼螺、赤豆螺之间的亲缘关系较近,而光滑狭口螺、梨形环棱螺与上述 4 个种的亲缘关系较远,其结果与新修订的淡水腹足目科级分类方案相当吻合。

关键词: 淡水腹足类;RAPD;亲缘关系;分子分类

中图分类号:Q959.211 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2003)03-07-07

Phylogenetic Relationships Among Some Freshwater Gastropoda as Revealed by RAPD Marks

PAN Bao-Ping^① YANG Yi^②

(^①School of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071;

^②Oncology Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract: Phylogenetic relationships between 6 freshwater snails, *Stenothyra glabra*, *Alocinma longicornis*, *Parafossarulus striatulus*, *Bithynia fuchsiana*, *Parafossarulus eximius* and *Bellamyia purificata* (Gastropoda, Mesogastropoda) were studied in detail using random amplified

* 国家基础科学人才培养基金资助项目(No. 国科金发计字第 108 号);

第一作者介绍 潘宝平,47 岁,博士研究生,副教授;主要从事软体动物遗传、分类与生态方面的研究;通讯联系:天津师范大学化学与生命科学学院 300074;E-mail:panpeter@public.tpt.tj.cn。

收稿日期:2002-09-15,修回日期:2003-03-20

polymorphism DNA (RAPD). Using twenty 10 bp random primers a total of 117 marks, ranging from 340 to 3 000 bp, were produced from these 6 species of snails. The variation of RAPD marks in the different species was high. The differentiation of RAPD marks in these different species of snails demonstrates the relationships in freshwater Gastropod phylogeny. Cluster analysis indicates that *Alocinma longicornis*, *Parafossarulus striatulus*, *Parafossarulus eximius* and *Bithynia fuchsiana* are much more closer compared to *Stenothyra glabra* and *Bellamyia purificata*, the latter belonging to a different family. The results coincide with the recent modified taxonomical system for the freshwater Mesogastropoda.

Key words: Freshwater Gastropod; RAPD; Phylogenetic relationship; Molecular classify

淡水腹足类的分布广泛、种群密度大,与水生生态系统的关系极为密切,其种类的地理区系、生态习性等特征常作为水产养殖、医学寄生虫、环境监测等方面研究的重要指标。作者在多年的软体动物区系调查中发现,有些淡水腹足类动物的种间分布相互重叠,近缘种之间不但生活习性近似,而且在发育的某些时期外形也极为相象。例如,长角涵螺与纹沼螺之间在外形上常出现一些中间类型,仅用形态分类进行鉴定具有一定的难度,需要建立一系列的快速、准确的分子种质鉴定技术。从现有的文献资料来看,国内有关腹足类进行非形态学分类的研究主要集中在核型分析^[9]、蛋白质比较^[1,11]及同工酶技术^[2-8,10]等方面。目前,国外已有关于腹足类 RAPD 随机扩增的研究论文^[12],但国内尚未见正式报道。另外,近年来一些贝类学者对中腹足目鳃螺科的分类提出了许多新的见解,原有的一些不合理分类阶元正在逐步修正。因此,本研究试图从分子水平比较几种淡水腹足类的遗传标记,为探讨它们的亲缘关系及系统分类提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 6种试验动物为中腹足目的光滑狭口螺(*Stenothyra glabra*)、长角涵螺(*Alocinma longicornis*)、纹沼螺(*Parafossarulus striatulus*)、赤豆螺(*Bithynia fuchsiana*)、大沼螺(*Parafossarulus eximius*)、梨形环棱螺(*Bellamyia purificata*) (对照)。以上动物均采自天津海河水系,用 0.002 5 m² 的采泥器,将底质的动物样品收于瓶

中带回实验室。每种动物选取成熟活体在水族箱内短期饲养,试验时进行活体解剖取出肝脏提取 DNA。

随机引物为上海生工公司产品。在 50 个 10 核苷酸引物预实验的基础上,筛选其中 20 个谱带清晰、稳定性和多态性较好的引物进行 RAPD 扩增。

PCR 试剂盒购自北京 TBD 生物公司。100 bp DNA Ladder 分子量标准购自 MBI 公司。

1.2 基因组 DNA 提取 参考萨姆布鲁克^[13]的方法,根据材料特征略加改进。每种动物活体解剖去壳后,取出肝脏组织在液氮下研磨成粉末,并将其逐步加入盛有近 10 倍体积的抽提缓冲液表面,后移至 50 ml 离心管中,置于 37℃ 温育 1 h。然后加蛋白酶 K 至终浓度为 100 μg/ml。裂解细胞悬液置于 50℃ 水浴中 3 h,后将溶液冷却至室温,加等体积经 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)平衡的酚,缓慢地颠倒离心管 10 min,在室温下以 5 000 g 离心 15 min,使两相分开。用酚反复抽提 3 次,将水相移至离心管中,加 0.2 体积的 10 mol/L 乙酸铵和 2 倍体积的乙醇, DNA 形成沉淀后,用 5 000 g 离心 5 min 收集之。用乙醇沉淀后 TE 缓冲液(pH 8.0)溶解,经核酸微量检测仪(瑞士 Phamecia 公司)检测 DNA 的纯度及浓度,置于 -20℃ 冰柜保存备用。

1.3 PCR 反应 用美国 PE 公司 9700 型 PCR 反应仪, RAPD 反应条件采用 Williams^[14]方法略加改进:94℃ 变性 5 min 后进行 45 个循环,每一循环包括 94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min;最后在 72℃ 延伸 10 min。每次反应均设不含模板

DNA 的空白对照。PCR 反应体系为 25 μ l, 其中含模板 DNA 25 ng, 引物 2 μ mol/L, dNTP 100 μ mol/L, 1 单位 *Taq* DNA 聚合酶, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l。

1.4 电泳 RAPD 产物 20 μ l 于 2% 琼脂糖凝胶电泳分离; 5 V/cm 电泳 40 min 后用 0.01% EB (溴化乙啶) 染色, 在紫外透照仪上观察和拍照。

1.5 数据处理 利用 F. James Rohlf^[15] 的 NTSYS 软件包对扩增结果进行系统分析。根据数值分类原理^[16], 对任意两试验组中某引物 (OPV) 的结合系数采用不加权对群法 (UPGMA), 数据以单个引物为基础记录种间的多态性。谱带的相似度 S_n 采用 Nei-Li^[17] 的公式: $S_n = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 计算出不同种间的随机扩增多态性 DNA 片段的相似性系数; 平均遗传距离指数按 Nei^[18] 方法。具体方法即将扩增的各谱带对应各种动物按 1.0 方式输入微机, 经程序聚类分析后得到扩增片段的相似度 (M)、遗传距离指数 (D) 的矩阵和聚类分析图。

2 结果

试验所用的 20 个引物共获得 117 条谱带, 单个引物扩增的 RAPD 标记在 3~12 个之间, 每个引物平均出现 5.9 个标记, 片段长度在 340~3 000 bp 之间。各引物序列及其扩增结果如表 1。

上述 6 种螺的 20 个随机引物扩增的 117 条谱带中, 有 90 条为多态性标记, 平均多态率为 76%, 表中序号带 * 的引物多态性较高。在长角涵螺、纹沼螺、赤豆螺和大沼螺相互之间的 RAPD 标记的变异性相对较小, 4 种螺的 20 个引物扩增标记中有 17 个表现出明显的多态性, 但其中有 12 个引物扩增标记的主要谱带分布型相似。在 6 种螺的 20 个引物扩增标记中, 有 58 个标记 (占总标记的 50%) 在不同动物中表现为单型性, 可以认为是该物种的 RAPD 特有标记。

图 1 引物 S2 (图 1:A) 在 6 种螺中扩增出 10 条谱带, 其中第 2 条 (2000bp) 在长角涵螺、纹

表 1 6 种螺遗传标记的随机扩增引物序列及

RAPD 扩增结果

引物	序列	扩增总位点数	多态性位点数	多态频率
S2*	TGATCCCTGG	10	9	0.90
S3	CATCCCCTG	4	1	0.25
S5	TGCCCCCTTC	5	3	0.60
S11*	GTAGACCCGT	9	8	0.88
S12	CCTTGAGGCA	6	4	0.66
S13	TTCCCCGCT	5	3	0.60
S16*	TTTGCCCGGA	3	3	1.00
S19	ACCCCGAAG	3	2	0.66
S23*	AGTCAGCCAC	10	8	0.80
S24	AATCGGGCTG	3	1	0.33
S25*	AGGGGTCTTG	4	4	1.00
S27	GAAACGGTG	3	2	0.66
S41*	ACCCGGAAGG	10	9	0.90
S42	GGACCCAACC	5	2	0.40
S44	TCTGGTGAGG	4	2	0.50
S46*	ACCTGAACGG	12	11	0.92
S47	TTGGCACGGG	4	4	1.00
S51*	AGCGCCATTG	10	9	0.90
S56	AGGGCGTAAG	4	3	0.75
S60	ACCCGGTCAC	3	2	0.66
	合计	117	90	0.76

沼螺、赤豆螺和赤豆螺含量最高, 确定为主带。上述四种螺的总带数分别为 6、7、7、8, 其中第 3、7 条谱带具有多态性, 但它们谱带的基本分布类型相似。光滑狭口螺共扩增出 4 条谱带, 其中的第 3 条 (1 200 bp) 为主带, 第 7 条具有单型性, 为该物种的特有标记。梨形环棱螺共扩增出 5 条谱带, 其中第 4 条 (800 bp) 为主带, 第 9 条为该物种的特有标记。引物 S11 (图 1:B) 共扩增出 9 条谱带, 其中第 1 条 (2 400 bp) 在 6 种螺中为共享带。第 2 条 (1 800 bp) 为长角涵螺、纹沼螺、赤豆螺和赤豆螺的主带, 第 4、7、9 条谱带具有明显的多态性。而光滑狭口螺的主带为第 3 条 (1 500 bp), 并且是该物种特有的 RAPD 标记。梨形环棱螺的主带为 2 条, 即谱带 1 (2 400 bp) 和谱带 8 (300 bp), 其谱带的分布区域也与其它动物明显不同。引物 S46 (图 1:C) 扩增的谱带数目及多态性都比较高, 共扩增出谱带 12 条, 其中第 7 条 (800 bp) 为长角涵螺、纹沼螺、赤豆螺和赤豆螺的主带, 第 5、9、10、11、12 条谱带在上述螺中表现出多态性, 但

谱带的基本分布区域和类型相似。光滑狭口螺的主带为第 1 条(3 000 bp), 并且是单型性标记。梨形环棱螺的主带为第 9 条(400 bp), 亦表现为该物种的特有标记。引物 S51(图 1:D)共扩增出 10 条谱带, 第 5 条(1 800 bp)带为长角涵螺、纹沼螺、赤豆螺和赤豆螺共有的主带, 而且其它谱带在上述动物中的共享度较高。光滑狭口螺的主带为第 10 条(250 bp), 并且其它 4 条

带(2、3、4、6)扩增物的含量均较高, 特异性显著。梨形环棱螺的主带为 2 条, 带 1(2 800 bp)和带 7(500 bp)的含量都比较高, 其分布区域也具有独特性。

将全部扩增的 20 个引物标记用 NTSYS 统计软件分析后, 得到 6 个物种间的 RAPD 标记的相似性系数(S)和遗传距离指数(D)的矩阵如表 2、3 所示。

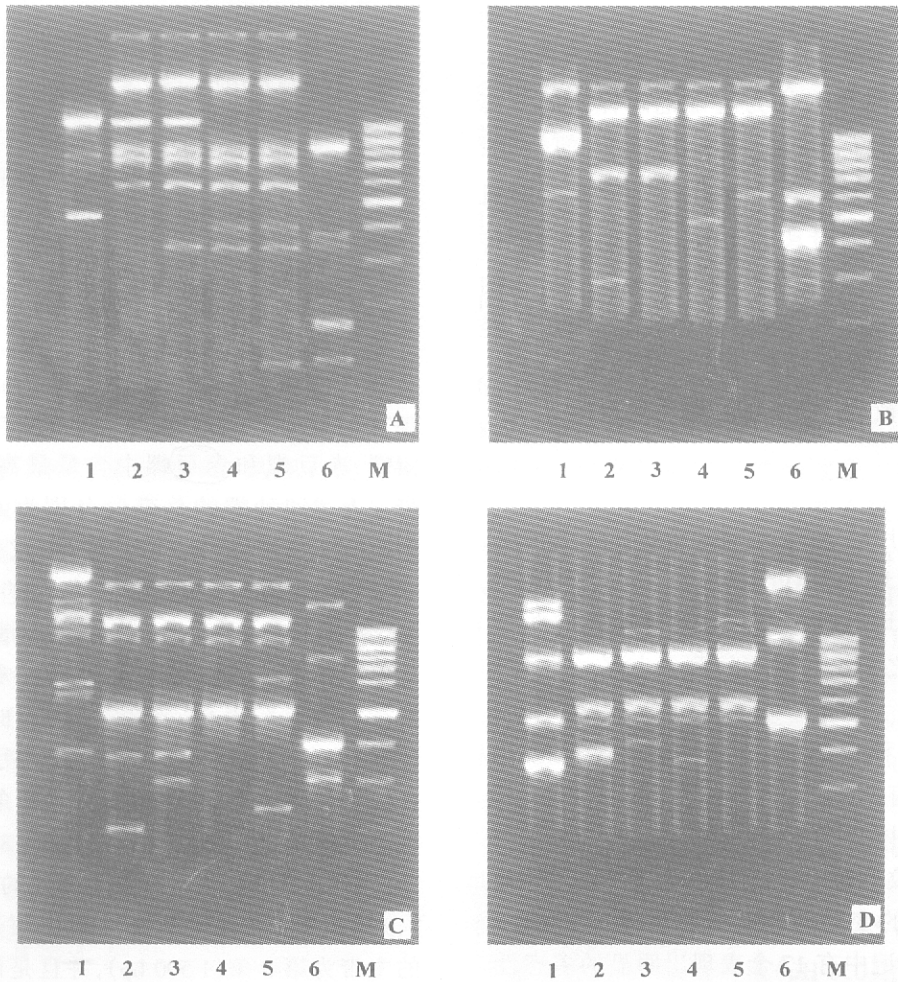


图 1 6 种螺基因组 DNA 用 S2(A)、S11(B)、S46(C)和 S51(D)引物扩增的产物电泳图
 1. 光滑狭口螺(*Stenothyra glabra*); 2. 长角涵螺(*Alcinma longicornis*); 3. 纹沼螺(*Parafossarulus striatulus*);
 4. 赤豆螺(*Bithynia fuchsiana*); 5. 大沼螺(*Parafossarulus eximius*); 6. 梨形环棱螺(*Bellamya purificata*);
 M. 100 bp 分子量标准(100 bp DNA Ladder)

表 2 6 种螺的随机扩增多态 DNA 片段相似性系数(S)矩阵

种 类	1	2	3	4	5	6
1. 光滑狭口螺 <i>Stenothyra glabra</i>	1.000 0					
2. 长角涵螺 <i>Alocinma longicornis</i>	0.406 2	1.000 0				
3. 纹沼螺 <i>Parafossarulus striatulus</i>	0.390 6	0.859 3	1.000 0			
4. 赤豆螺 <i>Bithynia fuchsiana</i>	0.468 7	0.750 0	0.765 6	1.000 0		
5. 大沼螺 <i>Parafossarulus eximius</i>	0.453 1	0.828 1	0.812 5	0.796 8	1.000 0	
6. 梨形环棱螺 <i>Bellamyia purificata</i>	0.609 3	0.390 6	0.312 5	0.453 1	0.437 5	1.000 0

表 3 6 种螺的随机扩增多态性 DNA 片段遗传距离指数矩阵(D)

种 类	1	2	3	4	5	6
1. 光滑狭口螺 <i>Stenothyra glabra</i>	0.000 0					
2. 长角涵螺 <i>Alocinma longicornis</i>	0.987 0	0.000 0				
3. 纹沼螺 <i>Parafossarulus striatulus</i>	0.987 9	0.114 1	0.000 0			
4. 赤豆螺 <i>Bithynia fuchsiana</i>	1.011 1	0.240 3	0.209 8	0.000 0		
5. 大沼螺 <i>Parafossarulus eximius</i>	0.948 1	0.153 4	0.159 7	0.201 3	0.000 0	
6. 梨形环棱螺 <i>Bellamyia purificata</i>	1.125 6	1.014 1	1.155 6	1.038 2	0.975 0	0.000 0

上述结果显示,长角涵螺、纹沼螺、大沼螺和赤豆螺的 RAPD 扩增标记之间相似性系数在 0.750 0 ~ 0.859 3 之间,而且遗传距离指数较小,于 0.114 1 ~ 0.240 3 之间,说明它们之间的亲缘关系较近。而光滑狭口螺、梨形环棱螺与上述 4 个种之间的遗传距离指数明显大于以上 4 种的相互距离,在 0.927 9 ~ 1.155 6 之间,扩增标记间的共享度较低,相似性系数仅在 0.312 5 ~ 0.468 7 之间,亲缘关系较远。此外,光滑狭口螺与梨形环棱螺二者之间的遗传距离指数达到 1.125 6,说明它们二者间的亲缘关系

也相当远。

将上述 6 种试验动物之间的随机扩增 DNA 片段的相似性系数 S 矩阵(表 2)和遗传距离指数 D 矩阵(表 3),输入 NTSYS 1.8 软件中的平均连续连锁聚类程序进行支序作图,得到的亲缘关系系统树如以下的图 2 和图 3 所示。

从 6 种螺的 RAPD 扩增标记相似性系数(S)及遗传距离指数(D)的聚类分析系统树看,长角涵螺、纹沼螺、大沼螺和赤豆螺可以视为亲缘关系相近的一组类群,而光滑狭口螺和梨形环棱螺则应归为其它类群。

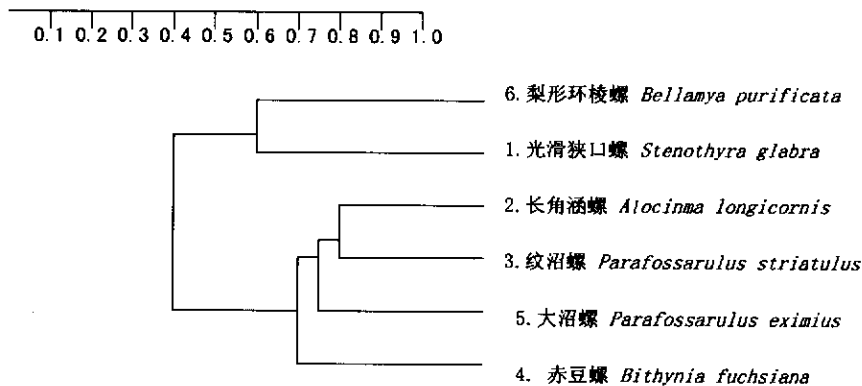


图 2 根据 6 种螺的 RAPD 相似性系数(S)矩阵的系统树

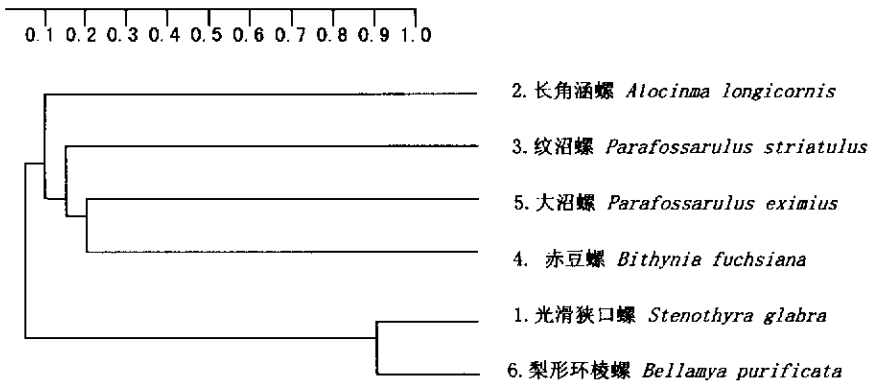


图3 根据6种螺的RAPD遗传距离指数(D)矩阵的系统树

3 讨论

目前在我国的淡水腹足类系统分类工作中,许多学者仍然采用 Annandale^[19]等人 1924 年建立的中腹足目分类方案,即将长角涵螺、纹沼螺、大沼螺、光滑狭口螺等中小型、壳圆锥状、具有鳃和触角、雄体右触角不特化为交接器的螺类归于鳃螺科。1973 年,Gray^[20]在《台湾地区淡水螺类》一文中,全面总结了鳃螺科动物的分类要点后指出:由于光滑狭口螺、图氏狭口螺(*Stenothyra toucheana*)等贝类的壳为圆桶状,壳口收缩,厝多为角质,并且厝的内缘具有明显的棱状突起,而该科的其它螺类均为石灰质厝,厝的内缘光滑。因此,他认为应将狭口螺类归于独立的狭口螺科(Stenothyridae)。20 世纪 90 年代,我国贝类学者刘月英^[21,22]在其编写的软体动物分类专著中,在归纳了前人对淡水中腹足目螺类的外生殖器电镜扫描结果后提出,原隶属于鳃螺科的长角涵螺、大沼螺、纹沼螺、赤豆螺、橈豆螺(*Bithynia misella*)等贝类的外生殖器肥大,并有复杂的附属物,明显区别于钉螺(*Oncomelania hupensis*)、拟钉螺(*Tricula cristella*)等鳃螺科动物的单一管状,无任何附属物的外生殖器,由此新建了豆螺科(Bithyniidae)。至于狭口螺类,她认为虽然其外生殖器比较简单,但由于其厝的独特性状,仍归于独立的狭口螺科比较恰当。

经典的贝类形态分类学具有内容丰富、材料翔实、逻辑严密、概括全面等优点。但是,由

于形态分类所分析归纳的结构特征均为基因表达加工后的产物,特别容易受到被观察对象的个体差异、生境变化等因素的干扰,尤其是在进行科、属等较高阶元划分时最易受到分类者主观态度的影响。因此,需要从基因组 DNA 水平加以印证或评价。早在 1990 年,Williams^[23]就指出:“RAPD 技术可以在不甚了解物种的分子遗传背景下,对物种的基因组及基因组间的微小变异进行比较分析,准确快速地提供种质遗传资料”。本研究的结果显示:长角涵螺、纹沼螺、大沼螺、赤豆螺之间 RAPD 扩增标记的遗传距离指数在 0.114 1~0.240 3 之间,聚类分析显示它们是亲缘关系较近的一组类群。光滑狭口螺的扩增标记比较特殊,它与上述 4 种螺相对遗传距离指数较大,在 0.948 1~1.011 1 之间,说明它与上述动物的亲缘关系较远。至于田螺科的对照动物梨形环棱螺,其形态分类与上述 5 种贝类有显著的差别,通过其基因组扩增可以看出,它与其它螺的相对遗传距离达到了 0.975 0~1.125 6,亲缘关系相当遥远,聚类分析说明它与光滑狭口螺都应各自归为不同的类群。由此可见,早期的形态分类学者可能由于这些腹足类的分布地域差别、生活习性不同或其它人为因素影响,使分类阶元的设置出现了一定的偏差。本试验结果与中腹足目新修订的科级分类方案相吻合,也说明 RAPD 技术是一种较为准确、有效、快速的分子分类手段。

但这里还应该指出,长角涵螺、纹沼螺、大沼螺之间的 RAPD 标记相似性系数达到 0.828 1

~0.859 3 之间,遗传距离指数仅在 0.114 1 ~ 0.153 4 之间,是本试验中亲缘关系最近的一组。尤其是长角涵螺与纹沼螺,在贝类形态学分类中,一般根据两种动物的壳高/宽比值、壳面有无细微的螺旋纹来区分,并分别归于不同的涵螺属和沼螺属。但是,在自然状态下它们通常生活在同一环境中,二者的外部形态十分接近,在幼体阶段通常难以区分,在自然种群中还常有许多介于二者外形之间的中间类型个体。笔者^[24,10,11]在以前的区系调查、蛋白质分析、同工酶研究分析时亦发现了类似问题。因此,有待于今后进行深入与综合的研究,使贝类的分类阶元真正反映出物种的本质特征和系统演化过程中的相互亲缘关系。

致谢 本试验研究的动物由中国科学院动物研究所刘月英研究员协助鉴定,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Davis G M, Lindsay G K. Disc electrophoretic analysis of molluscan individuals and populations. *Molacologia*, 1967(5): 311 ~ 334.
- [2] Wrigh C A, Rollinson D. Analysis of enzymes in *Bullinus* Africans group (Mollusca-Planorbidae) by isoelectric focusing. *J Natur Hist*, 1979(13):263 ~ 273.
- [3] Rollinson D. The use of enzymes in taxonomy of *Bullinus*. *Thans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1979(73):601 ~ 602.
- [4] Malek E A, Pile S K. Electrophoretic studies on the digestive gland esterases of some *Biomphalaria* and *Lymnaid* snails. *Bull WHO*, 1971(45):819 ~ 825.
- [5] Narang S, Narang N. Esterases in *Biomphalaria glabratus* (Mollusca: Pulmonata): characterization, polymorphism, inheritance pattern and interspecific differences. *Ann Acad Brasil Ciene*, 1975(47): 4(Abstract).
- [6] Jelnes J E. Taxonomical studies on *Bullinus* using isoenzyme electrophoresis with special reference to the africanus group on Kano Plain, Kenya. *Malacologia*, 1979(18): 147 ~ 149.
- [7] 郭源华,许学积.钉螺的同工酶和核糖核酶的研究.中国医学科学院学报,1980(2):209 ~ 212.
- [8] 许学积,郭源华.各地钉螺 α -磷酸甘油脱氢酶和酯酶同工酶变异的研究.动物学杂志,1982(2): 1 ~ 4.
- [9] 周墩,周密,吴振东.田螺科五种螺的核型研究.动物学报,1988,34(4):363 ~ 370.
- [10] 潘宝平,纪炳纯.几种淡水腹足类酯酶同工酶的比较研究.南开大学学报(自然科学版),1995,28(4): 26 ~ 31.
- [11] 潘宝平,张耀光.六种淡水腹足类足肌蛋白质的比较.西南师范大学学报(自然科学版),2002,27(2): 210 ~ 214.
- [12] Stothard J R. An evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification and phylogeny of freshwater snails of the genus *Bullinus* (Gastropoda, Planorbidae). *J Moll Stud*, 1996(62): 165 ~ 176.
- [13] 萨姆布鲁克(金冬雁译).分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社,1992.
- [14] Williams J C K, Hanafey M K, Rafalski J A, et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 1993(218):704 ~ 740.
- [15] Rohlf F J. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Applied biostatistical Inc, 1993.
- [16] 钟扬,陈家宽.数量分类学的方法与程序.武汉:武汉大学出版社,1990. 144 ~ 190.
- [17] 马文辉,何平,袁小凤等. RAPD 标记在植物系统进化研究中的应用.西南师范大学学报(自然科学版),1999,24(4):482 ~ 491.
- [18] Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987. 230 ~ 236.
- [19] Annandale N, Prashad B. Report on a small collection of molluscs from the Chekiang Province of China. *Proc Malac Soc*, 1924,16(1):27 ~ 49.
- [20] Gray L P. The freshwater snails of Taiwan. *Malacological Review*, 1973(1):34 ~ 46.
- [21] 蔡如星,黄维灏,刘月英等.浙江动物志——软体动物.杭州:浙江科学技术出版社,1991. 53 ~ 64.
- [22] 刘月英,张文珍,王耀先.医学贝类学.北京:海洋出版社,1993. 30 ~ 51.
- [23] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acid Res*, 1990(18):6 531 ~ 6 535.
- [24] 潘宝平,高振清,张庆喜.天津地区淡水腹足类的区系研究.天津教育学院学报(自然科学版),1995(35):3 ~ 6.