

贵州福泉分布桃花水母的 形态特征及分子鉴定

陶莎^① 姚俊杰^{①*} 杨梅^① 谭华^① 石让安^②

^① 贵州大学渔业资源与环境研究所, 高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室 贵阳 550025;

^② 贵州省福泉县水产站 贵阳 550025

摘要: 2017年10月,在贵州省福泉县发现了桃花水母(*Craspedacusta*)。观察其形态结构,福泉的桃花水母与索氏桃花水母(*C. sowerbyi*)高度相似。采用PCR和DNA测序技术扩增和测定了福泉采集桃花水母的核糖体小亚基rRNA基因(18S rRNA)、核糖体RNA基因内转录间隔区(ITS)及线粒体细胞色素氧化酶亚基基因(COI),并与GenBank上已有的桃花水母18S rRNA、ITS、COI基因序列进行了比对。分子鉴定结果显示,福泉的桃花水母18S rRNA、ITS、COI基因序列与索氏桃花水母相似度分别为100%、92%、99%,确定贵州省福泉市发现的桃花水母样品在种分类水平上为索氏桃花水母。并就桃花水母的某些形态学分类指标的标准、不同伞径之间的差值是否能作为桃花水母形态分类的一个新指标这些问题做了讨论。

关键词: 桃花水母; 形态学; 18S rRNA; ITS; COI

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 03-362-13

Morphological Characteristics and Molecular Identification of *Craspedacusta* in Fuquan, Guizhou

TAO Sha^① YAO Jun-Jie^{①*} YANG Mei^① TAN Hua^① SHI Rang-An^②

^① *Institute of Fisheries Resources and Environment, Guizhou University, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guiyang 550025;*

^② *Fuquan County Aquaculture Techniques Station of Guizhou Province, Guiyang 550025, China*

Abstract: In October 2017, some *Craspedacustas* were discovered in Fuquan County, Guizhou province. In order to determine its taxonomy, we first observed and measured its morphological structures, and then amplified and sequenced its 18S rRNA, ITS and COI by PCR and DNA sequencing, then finally compared its 18S rRNA, ITS and COI gene sequences with other *Craspedacustas*' gene sequences in GenBank. The results

基金项目 贵州省黔西南特色产业扶持与生态修复协同创新中心平台建设项目(黔科合 2016-18), 贵州省水产产业体系项目(No. GZCYTZX2013-011);

* 通讯作者, E-mail: junjieyao@163.com;

第一作者简介 陶莎, 女, 硕士研究生; 研究方向: 渔业资源与环境; E-mail: Quella tao@hotmail.com。

收稿日期: 2018-09-20, 修回日期: 2019-02-22 DOI: 10.13859/j.cjz.201903006

showed that the umbrella diameter, level of tentacles, shape of statocyst and other morphology structures of *Craspedacusta* in Fuquan were highly similar to those of *Craspedacusta sowerbyi* (Table 1 and Table 5); the 18S rRNA and COI sequences of *Craspedacusta* in Fuquan was highly similar to those of *C. sowerbyi* (KY077287.1, MF000493.1), and the similarity rates were 100%, 99% respectively; the ITS sequences of *Craspedacusta* in Fuquan was highly similar to that of *C. ziguiensis* (AY513637.1), and the similarity rate was 99%. The genetic distances of 18s rRNA, ITS, COI gene sequences between *Craspedacusta* in Fuquan and *C. sowerbyi* were 0.001, 0.023, 0.012 respectively (Table 2 - 4). Based on 18s rRNA and COI gene region, the Neighbor-Joining (NJ) trees showed that *Craspedacusta* in Fuquan was the same species with *C. sowerbyi*; Based on ITS gene region, the NJ trees showed that *Craspedacusta* in Fuquan was the same species with *C. ziguiensis* (Fig. 6 - 8). Taken consideration of all the results of morphological observation and molecular identification, we determined that the *Craspedacusta* in Fuquan, Guizhou province was *C. sowerbyi*. We discussed some standards of morphological structure index of *Craspedacusta*, the possibility of using difference between umbrella diameters as a new classification standard in morphological taxonomy and give some opinions on methods for analyzing morphological structure.

Key words: *Craspedacusta*; Morphological structure; 18S rRNA; ITS; COI

桃花水母隶属腔肠动物门 (Coelenterata) 水螅纲 (Hydrozoa) 淡水水母目 (Limnomedusae) 笠水母科 (Olindiidae) 桃花水母属 (*Craspedacusta*), 是世界上珍稀的水生生物之一, 已经在地球上生存了 5.5 亿年甚至更长的时间 (何振武 2005)。目前, 世界上公认的桃花水母有效种为 3 种, 即英国的索氏桃花水母 (*C. sowerbyi*)、日本的伊氏桃花水母 (*C. iseanum*) 和中国的中华桃花水母 (*C. sinensis*) (胡义波 2005, 苏春分等 2009)。中国作为桃花水母分布最广泛的国家, 已在 19 个省、市、区发现过桃花水母, 目前已报道过桃花水母属的 12 种 (亚种) 桃花水母 (万辛如等 2013)。此前在贵州省的独山县 (岑戈潜 2004)、贵阳市百花湖 (梁正其等 2011) 等地也发现过桃花水母, 对桃花水母有初步的认识与了解。

就目前对桃花水母的分类而言, 胡义波等 (2006 a,b) 认为桃花水母有 3 种, 即英国的索氏桃花水母、日本的伊氏桃花水母和中国的中华桃花水; 和振武 (2005) 与苏春分 (2009) 认为桃花水母有 11 种, 宋大祥等 (2002) 认为有 12 种, 其中大多数桃花水母种以发现地命

名。由于桃花水母分布广泛, 各地标本个体差异较大, 同一水域中发现的桃花水母通常是一个群体, 群体中有不同发育阶段和不同性别的个体, 伞体差异大, 因此, 以各地命名的一些标本, 可能会因采样标本的局限、个体的收缩性、雌雄差异、性腺形状颜色等, 导致鉴定上的不确定性。

随着分子技术的发展, 近年来 DNA 序列分析已被广泛应用于动物分类学研究领域, 越来越多的学者利用基因测序技术来开展桃花水母属的分类研究。已有徐善良等 (2010)、胡义波等 (2006a)、蔡延森等 (2014)、迟艳红等 (2016) 利用 18S rRNA、ITS、COI 等片段的测序技术对桃花水母进行了分类学研究。

本实验采用测定福泉的桃花水母的 18S rRNA、ITS、COI 多个基因片段来鉴定证实福泉的桃花水母的分类地位。18S rRNA 长度适中, 具有较高的保守性, 进化速度相对缓慢, 能提供足够的信息, 而作为非编码区的 ITS 区, 其所承受的条件选择压力较小, 因此进化速率较快, 核苷酸替换率较高, 能够提供较为丰富的生物学变异信息 (徐善良等 2010, 迟艳红等 2016)。线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因

(COI) 已被广泛采纳为通用的标准条形码基因片段, 在鱼类等水产动物的分类中大量使用, 但在桃花水母分子鉴定方面并不如 18S 和 ITS 应用的广泛, 因此本实验采用综合测定 18S rRNA、ITS、COI 三个序列区来鉴定福泉的桃花水母的分类地位, 使其结果更准确, 丰富桃花水母分子鉴定的数据信息。

2017 年 10 月中旬, 在贵州省福泉县金山街道太平村箭巴林组 (E107°14'24" ~ 107°45'35", N26°32'28" ~ 27°02'23") 一池塘中发现了桃花水母, 池塘大小 9 m × 4 m, 水温 16 ~ 17 °C, pH 6.5, 水体颜色呈绿色, 混养有草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)。观察了该地桃花水母的基本形态特征, 并进行了 18S rRNA、ITS、COI 三种基因序列的测定, 以期通过形态观察和分子鉴定确定福泉所分布桃花水母的种类。

1 材料与方 法

1.1 样品采集及保存

桃花水母于 2017 年 10 月中旬取自贵州省福泉县金山街道太平村箭巴林组一池塘, 在现场初步观察其基本形态, 并将部分桃花水母个体放入 10% 的甲醛溶液中固定保存, 以便后期取样观察。在现场将活体桃花水母去除性腺、消化腔等组织后, 剩余伞体部分保存于装有无水乙醇的离心管中, -20 °C 保存备用, 用于进行分子鉴定。

1.2 形态学观察及测量方法

随机挑选出个体大小平均的 55 只成体桃花水母作为测量的样本。取桃花水母活体样品和固定样品于盛有约 1 ml 清水的载玻片上, 在显微镜和解剖镜下, 观察活体桃花水母的平衡囊形状, 主幅触手、触手级数、触手上刺丝囊疣形状和排列方式, 以及生殖腺个数、颜色和形状结构。

将活体桃花水母置于载玻片上, 滴 1 ~ 3 滴清水, 刚好覆盖桃花水母伞体, 并用吸管围绕桃花水母伞体 360° 反复轻轻往外吸伞体, 让

其保持伞体舒展到最大程度, 然后立即用游标卡尺进行伞径、口径、缘膜的测量, 数据精确到 0.1 mm。以桃花水母的四条主幅触手生长处分为四个点 A₁、A₂、A₃、A₄, 每两条主幅触手之间弧形的中点为另外四点 B₁、B₂、B₃、B₄, 测量了 55 只活体桃花水母的四条伞径 A₁-A₂、A₃-A₄ 和 B₁-B₂、B₃-B₄ (图 1)。

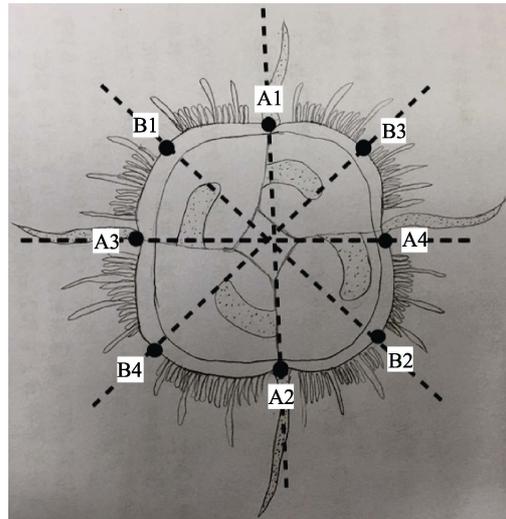


图 1 伞径测量示意图

Fig. 1 Schematic diagram of umbrella diameter

1.3 分子鉴定方法

取离心管中无水乙醇保存的 10 只桃花水母, 利用磁珠法动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程公司) 提取 DNA, 提取的 DNA 置于 1.5 ml 离心管中 -20 °C 保存备用。

扩增 18S rRNA 的 PCR 引物共 4 对。第 1 对为引物 A, 根据 Medlin 等 (1988) 设计的引物序列合成, A₁ 5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3', A₂ 5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3', 扩增片段长度为 1 800 bp 左右。第 2 ~ 4 对皆为引物 B, 根据徐善良 (2010) 的研究中重新设计的 3 对引物序列合成, 分别为引物 B_a、引物 B_b、引物 B_c, B_{a1} 5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3', B_{a2} 5'-CGT CAC AAA TCC TAC GCA CAC-3'; 引物 B_{b1} 5'-GTA ATT CCA GCT CCA ATA GCG-3', B_{b2} 5'-CCC

ATA GAA TCA AGA AAG GGC-3'; 引物 B_{c1} 5'-TTA TAT ACG ACC TCG TTG GCA CC-3', B_{c2} 5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3', 扩增片段长度为 700 bp 左右, 三段序列可通过软件重新拼接形成一段长度约为 1 800 bp 的序列片段。引物 A 与引物 B 都可单独用于桃花水母属 18S rRNA 序列的分子鉴定。

18S rRNA 的 PCR 反应扩增体系总体积为 25 μ l, 包括去离子水 8 μ l, Taq MasterMix (TaKaRa Bio 公司) 13 μ l, 上下游引物各 1 μ l (20 μ g/L), 模板 DNA 2 μ l (浓度 80 μ g/L)。引物 A 的 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s, 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。引物 B_a、B_b、B_c 的 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

ITS 的 PCR 扩增引物 1 对, 根据邹秀 (2012) 设计的引物序列合成, 扩增片段长度为 750 bp 左右, ITS₁ 5'-GTC GTA ACA AGG TTT CCG TAG G-3', ITS₂ 5'-GGT AGT CTT GCC TGA TCT GAG G-3'。ITS 的 PCR 反应扩增体系总体积为 50 μ l, 包括去离子水 36.5 μ l, 10 \times Ex Taq buffer 5 μ l, dNTP Mix 4 μ l, Ex Taq 酶 0.5 μ l (以上 PCR 相关制品皆购于 TaKaRa Bio 公司), 上下端引物各 1 μ l (20 μ g/L), 模板 DNA 2 μ l (浓度 100 μ g/L)。ITS 引物的 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 66 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

COI 的 PCR 扩增引物 1 对, 采用 COI 通用引物 (宁平 2012), 扩增片段长度为 750 bp 左右, COI₁ 5'-TCA ACC ACC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3', COI₂ 5'-TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA-3'。COI 的 PCR 反应扩增体系总体积为 50 μ l, 包括去离子水 36.5 μ l, 10 \times Ex Taq buffer 5 μ l, dNTP Mix 4 μ l, Ex Taq 酶 0.5 μ l, 上下端引物各 1 μ l (20 μ g/L), 模板 DNA 2 μ l (浓度 100 μ g/L)。COI 引物的

PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 45 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

18S rRNA、ITS、COI 的 PCR 产物采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带后送往上海生物工程公司进行 DNA 双向测序, 得出的结果利用 SeqMan、Bio Edit 等分析软件进行基因序列拼接整理, 并与 GenBank 收录的桃花水母的 18S rRNA、ITS、COI 基因序列进行相似性对比, 用 MEGA6 分析软件计算各序列间的相对遗传距离, 并构建邻接 (neighbor joining, NJ) 分子系统树, 系统树各分支的置信度由 Bootstrap 1 000 次循环检验 (置信度显示值最高为 100, 最低 0, 各分支之间显示数值越高, 置信度越高)。

2 结果

2.1 福泉的桃花水母的主要形态特征

2.1.1 缘膜 桃花水母伞体凸起向上的部分称为上伞部, 凹面向下的部分称为下伞部, 下伞部的内腔称为伞腔, 自下伞部边缘向内生出一圈薄膜, 称为缘膜。福泉的桃花水母的缘膜宽度平均 (1.59 \pm 0.47) mm。当伞体收缩时, 缘膜最窄, 几乎不可见; 当伞体舒张时, 被压缩的伞体恢复原形, 身体下沉, 此时缘膜最宽 (表 1, 图 2a)。

2.1.2 垂管、口唇 福泉的桃花水母, 其垂管悬挂于下伞部中央, 呈四棱柱状, 与 4 个性腺相连接, 垂管的长短随个体大小不同而有所差异; 末端具 4 片像裙边散开的唇, 中央为口, 口的周围具有环状的口唇, 口径平均为 (4.5 \pm 0.5) mm。桃花水母捕食后通过触手将食物送入口中, 垂管内壁肌肉缓慢蠕动将食物移送到消化腔中 (表 1, 图 2b、c)。

2.1.3 触手、刺丝囊疣 福泉的桃花水母伞缘周围有触手, 分三级, 数目约在 260 ~ 453 之间, 长短不一, 观察到最小的伞径约为 2 mm 的水母体, 触手为 69 根, 还不能明显区分出三级触手, 除明显的 4 根主幅触手外, 其余触

表 1 形态学指标测量结果 ($n = 55$)

Table 1 Morphological index measurement results

结构 Structures	结果 Results	结构 Structures	结果 Results
伞径 A ₁ -A ₂ (mm) Umbrella diameter A ₁ -A ₂	11.94 ± 1.45	刺丝囊疣形状和排列方式 Shape and arrangement of nematocyst warts	乳突状, 环形排列 Papillate, annular arrangement
伞径 A ₃ -A ₄ (mm) Umbrella diameter A ₃ -A ₄	11.98 ± 1.49	主幅触手 Main tentacles	4 根, 明显较长 Four, obviously longer
伞径 B ₁ -B ₂ (mm) Umbrella diameter B ₁ -B ₂	12.92 ± 1.49	平衡囊形状 Shape of statocyst	管型 Tube shape
伞径 B ₃ -B ₄ (mm) Umbrella diameter B ₃ -B ₄	12.98 ± 1.52	平衡石形状 Shape of statolith	圆球型 Spherical shape
触手级数 Levels of tentacles	3	缘膜宽度 (mm) Width of velum	1.59 ± 0.47
触手数目 (只) Number of tentacles	260 ~ 453	生殖腺形状及颜色 Shape and color of gonad	三角囊状、小囊状、浅绿色 Triangular cysts, small cysts, light green
口径宽度 (mm) Width of mouth	4.5 ± 0.5		

手相似。

位于触手上的刺丝囊疣的形状和排列方式一般均作为桃花水母重要的形态分类特征, 福泉的桃花水母刺丝囊疣呈乳突状, 环状排列, 显微镜下呈淡绿色, 与水母的伞体色相似。刺丝囊疣上有许多刺丝囊, 能射出刺丝杀死或者麻醉浮游动物, 如轮虫, 故触手是桃花水母主要的捕食器官 (表 1, 图 2d ~ g)。

2.1.4 平衡囊、平衡石 在伞缘与触手之间具有平衡囊, 内有平衡石, 是平衡器官。平衡囊形状是桃花水母一个重要的形态学鉴别特征, 福泉的桃花水母的平衡囊呈管型, 平衡石呈圆球型 (图 2h)。

2.1.5 消化腔 消化腔位于下伞部的中央, 呈菱形, 它向四周分出四条放射状的辐管, 中接性腺, 再连到伞的边缘, 与环绕伞缘的环管相通 (图 2i)。

2.1.6 福泉的桃花水母的形态指标参数 福泉的桃花水母成体平均伞径为 (12.46 ± 1.58) mm, 伞径 A₁ - A₂、A₃ - A₄ 分别为 (11.94 ± 1.45) mm 和 (11.98 ± 1.49) mm, 伞径 B₁ - B₂、B₃ - B₄ 分别为 (12.92 ± 1.49) mm 和 (12.98 ± 1.52) mm; 伞径 B₁ - B₂、B₃ - B₄ 分别比伞径 A₁ - A₂、A₃ - A₄ 长约 1 mm。

福泉的桃花水母的触手分三级, 数量 260 ~ 453, 其中主幅触手明显长于其他触手, 共 4 根。缘膜宽度平均 (1.59 ± 0.47) mm, 最宽 3.1 mm, 最窄 1 mm; 口径平均 (4.5 ± 0.5) mm, 最宽 5.2 mm, 最窄 3.8 mm。性腺 4 个, 呈淡绿色, 为三角囊状和小囊状 (表 1)。

2.2 福泉的桃花水母分子鉴定

2.2.1 PCR 扩增结果 对贵州福泉的桃花水母的 18S rRNA 序列区进行 PCR 扩增, 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 引物 A 扩增得到 1 条长度为 1 800 bp 左右的目的产物, 引物 B_a、B_b、B_c 均扩增得到长度为 750 bp 左右的目的产物 (图 3)。利用 SeqMan、Bio Edit 分析软件进行基因序列拼接整理, 将引物 B_a、B_b、B_c 扩增得到的 3 条序列拼接得到一条 1 800 bp 左右的目的产物。引物 A 扩增得到的基因序列与引物 B 扩增得到的基因序列一致, 没有变异位点。

对贵州福泉的桃花水母的 ITS 和 COI 序列区进行 PCR 扩增, 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 分别得到 1 条长度约为 750 bp 和 700 bp 的目的产物 (图 4, 5)。

2.2.2 福泉的桃花水母 18S rRNA、ITS、COI 区基因的测序对比结果 测序获得福泉的桃花水母 18S rRNA、ITS、COI 基因序列, 利用

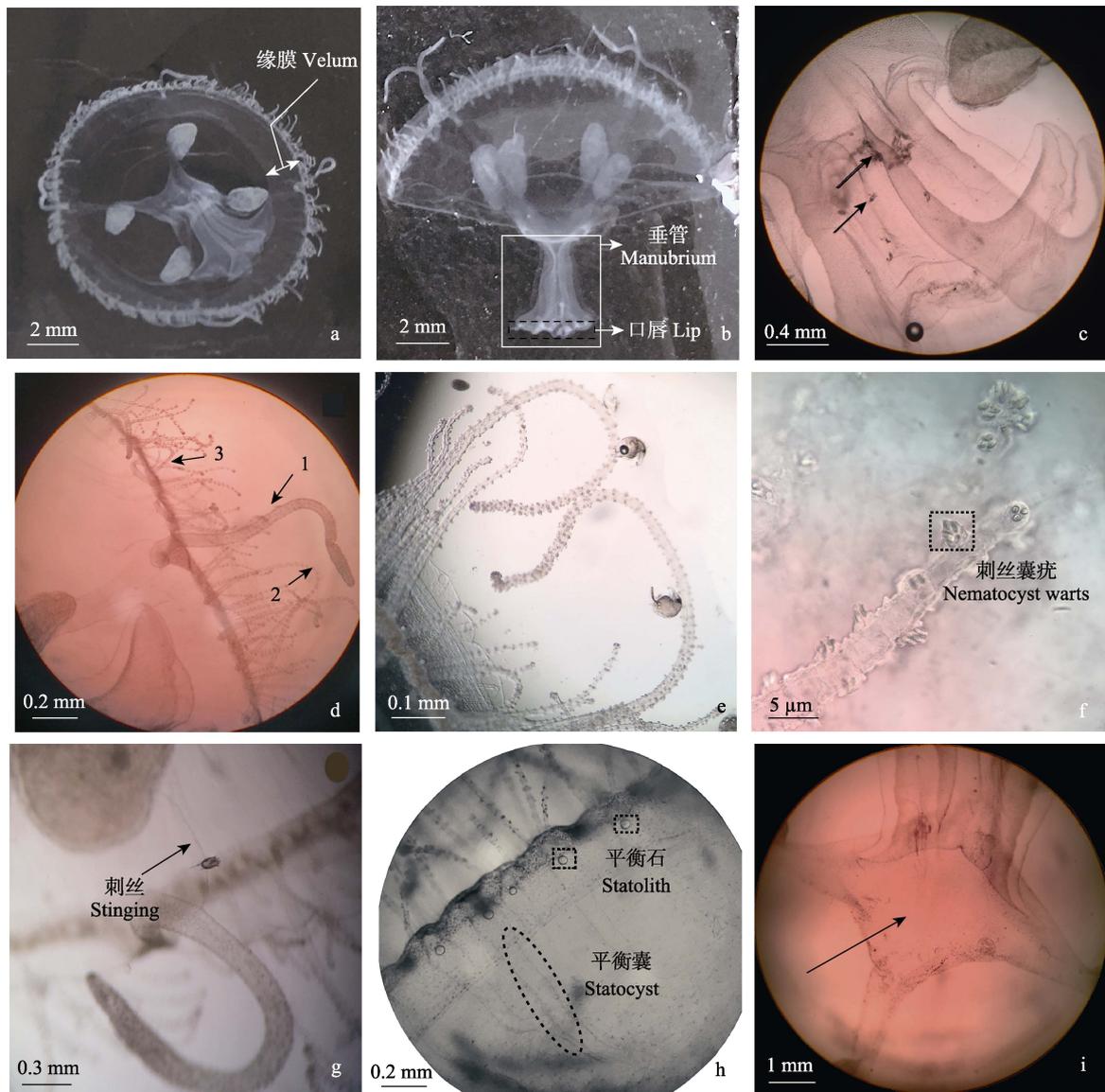


图 2 福泉的桃花水母的结构形态

Fig. 2 Morphological structure of *Craspedacusta* in Fuquan

a. 缘膜; b. 垂管和口唇; c. 垂管中的轮虫及其他浮游动物 (箭头处); d. 三级触手, 1、2、3 分别指示一、二、三级触手; e. 捕捉浮游动物触手; f. 刺丝囊疣; g. 触手释放刺丝捕捉麻醉轮虫; h. 平衡器官; i. 消化腔 (箭头处)。

a. Velum; b. Manubrium and lip; c. Rotifers and other zooplankton in manubrium (direction of arrow); d. Three level tentacles, 1, 2, 3 refer to first, second, third tentacles respectively; e. The tentacles are catching zooplankton; f. Nematocyst warts; g. Trapping and anaesthetized rotifers by stinging; h. Balance organs; i. Digestive cavity (direction of arrow).

NCBI 中的 Blast, 与 GenBank 中已有桃花水母 18S rRNA、ITS、COI 基因序列进行多序列比对。福泉的桃花水母与已知索氏桃花水母的 18S rRNA 基因序列 (AF358057.1) 相似性达

到了 100%; ITS 基因序列与已知稀归桃花水母的 ITS 基因序列 (AY513637.1) 相似性为 99%, 与索氏桃花水母 (FJ423631.1、FJ423623.1、FJ423626.1) 相似度均在 92% 以上; COI 基因

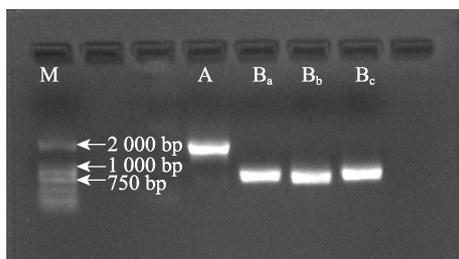


图3 福泉的桃花水母 18S rRNA 区 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of 18S rRNA of *Craspedacusta* in Fuquan

M. DL2000 DNA 分子量标准; A. 引物 A 扩增出的 18S rRNA 序列; B_a、B_b、B_c. 引物 B_a、B_b、B_c 扩增出的 18S rRNA 序列。

M. DL2000 DNA marker; A. Amplified sequence of 18S rRNA by primer A; B_a, B_b, B_c. Amplified sequences of 18S rRNA by primer B_a, B_b, B_c.

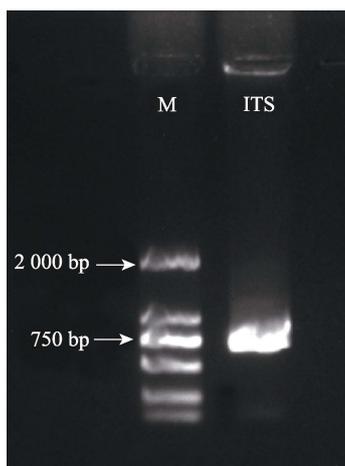


图4 福泉的桃花水母 ITS 区 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplification results of ITS of *Craspedacusta* in Fuquan

M. DL2000 DNA 分子量标准; ITS. 福泉的桃花水母 ITS 区序列。

M. DL2000 DNA marker; ITS. ITS sequence of *Craspedacusta* in Fuquan.

序列与已知索氏桃花水母的 COI 基因序列 (MF000493.1) 相似性为 99%。综合判定贵州福泉发现的桃花水母为索氏桃花水母。

基于 18S rRNA 序列, 福泉的桃花水母与索氏桃花水母的遗传距离保持在 0.001 ~ 0.004 之间, 与在美国发现的索氏桃花水母

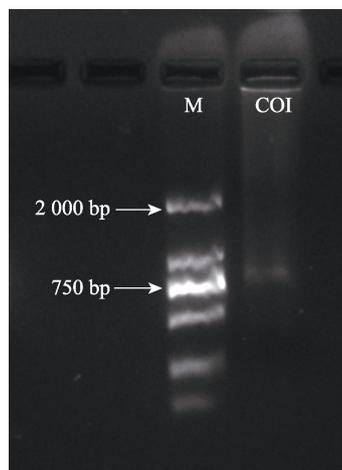


图5 福泉的桃花水母 COI 区 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR amplification results of COI of *Craspedacusta* in Fuquan

M. DL2000 DNA 分子量标准; COI. 福泉的桃花水母 COI 区序列。

M. DL2000 DNA marker; COI. COI sequence of *Craspedacusta* in Fuquan.

(KY077287.1、AF358057.1) 和平阳发现的索氏桃花水母 (FJ897538.1) 遗传距离仅为 0.001, 与中华桃花水母的遗传距离为 0.012 (表 2)。邻接系统进化树显示, 福泉的桃花水母与美国发现的索氏桃花水母 (KY077287.1) 聚为一支 (图 6)。

基于 ITS 序列, 福泉的桃花水母 ITS 序列区与秭归桃花水母的遗传距离为 0.010, 与德国发现的索氏桃花水母遗传距离保持在 0.023 ~ 0.025 之间, 与嘉定桃花水母 (*C. kiatingi*) 遗传距离为 0.025, 与浙江安吉发现的信阳桃花水母 (*C. xinyangensis*) 遗传距离为 0.109, 与中华桃花水母的遗传距离保持在 0.243 ~ 0.244 (表 3), 从遗传距离来看, 福泉的桃花水母的 ITS 区序列与秭归桃花水母和索氏桃花水母遗传距离都很近。邻接系统进化树显示福泉的桃花水母与秭归桃花水母聚为一支 (图 7)。

基于 COI 序列, 福泉的桃花水母 COI 序列不同地区的索氏桃花水母遗传距离保持在 0.012 ~ 0.243 之间, 其中与瑞士发现的索氏桃花水母 (MF000493.1) 遗传距离最近 (表 4),

表 2 基于 18S rRNA 区基因不同地区桃花水母的遗传距离

Table 2 Genetic distances between different regions of *Craspedacusta* based on 18S rRNA

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 索氏桃花水母 (美国) <i>C. sowerbyi</i> in America KY077287.1												
2 索氏桃花水母 (平阳) <i>C. sowerbyi</i> in Pingyang FJ897538.1	0.002											
3 索氏桃花水母 (美国) <i>C. sowerbyi</i> in America AF358057.1	0.002	0.000										
4 索氏桃花水母 (横溪) <i>C. sowerbyi</i> in Hengxi FJ897542.1	0.003	0.001	0.001									
5 索氏桃花水母 (象山) <i>C. sowerbyi</i> in Xiangshan FJ897543.1	0.003	0.001	0.001	0.002								
6 索氏桃花水母 (宁波) <i>C. sowerbyi</i> in Nibong FJ897541.1	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002							
7 索氏桃花水母 (杭州) <i>C. sowerbyi</i> in Hangzhou FJ897539.1	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002						
8 索氏桃花水母 (永康) <i>C. sowerbyi</i> in Yongkang FJ897537.1	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002					
9 索氏桃花水母 (象山) <i>C. sowerbyi</i> in Xiangshan FJ897540.1	0.004	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004				
10 索氏桃花水母 (阳山) <i>C. sowerbyi</i> in Yangshan DQ086156.1	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003			
11 中华桃花水母 (美国) <i>C. sinensis</i> in America EU247815.1	0.013	0.012	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.013		
12 福泉的桃花水母 <i>Craspedacusta</i> in Fuquan	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.002	0.012	

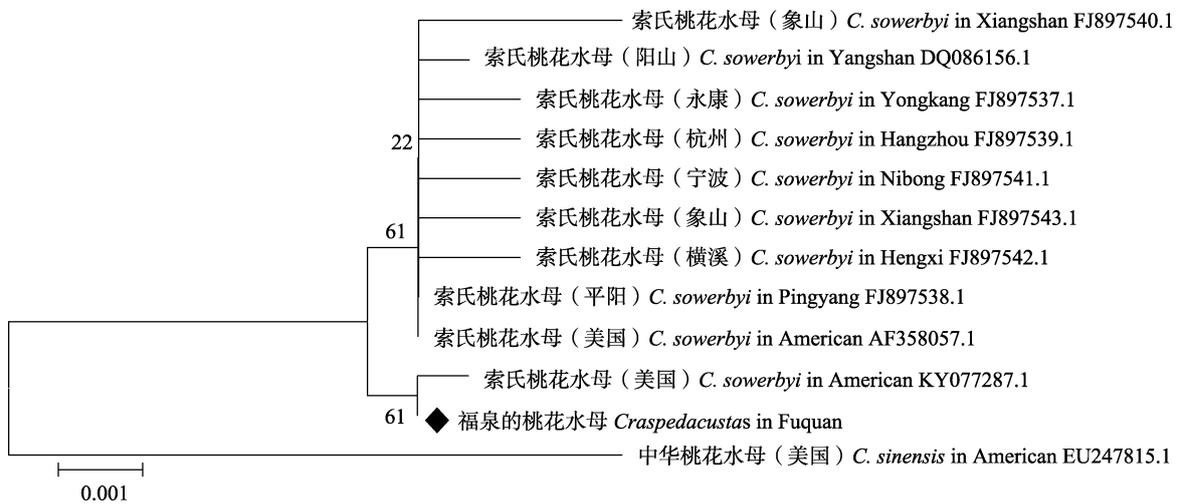


图 6 福泉与其他地区桃花水母的 18S rRNA 区系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree between *Craspedacusta* in Fuquan and other areas' 18S rRNA based on neighbor-joining method

菱形标为福泉样品；各支上数据为 Bootstrap 1 000 给出分支置信度；标尺刻度表示遗传距离。

The rhombus is the sample in Fuquan; Each data in branch given by Bootstrap 1 000 which means branch credibility; The staff gauge reticle represents the genetic distance.

表 3 基于 ITS 区基因建立的不同地区桃花水母的遗传距离

Table 3 Genetic distances between different regions of *Craspedacusta* based on ITS

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 秭归桃花水母 (秭归) <i>C. ziguiensis</i> in Zigui AY513637.1										
2 索氏桃花水母 (德国) <i>C. sowerbyi</i> in Germany FJ423631.1	0.020									
3 索氏桃花水母 (德国) <i>C. sowerbyi</i> in German FJ423623.1	0.022	0.002								
4 嘉定桃花水母 (云台山) <i>C. kiatingi</i> in Yuntaishan AY513619.1	0.022	0.002	0.000							
5 嘉定桃花水母 (虎峪) <i>C. kiatingi</i> in Huyu AY513616.1	0.022	0.002	0.000	0.000						
6 索氏桃花水母 (德国) <i>C. sowerbyi</i> in German FJ423626.1	0.022	0.002	0.000	0.000	0.000					
7 信阳桃花水母 (安吉) <i>C. xinyangensis</i> in Anji AY513635.1	0.107	0.106	0.107	0.107	0.107	0.107				
8 中华桃花水母 (重庆) <i>C. sinensis</i> in Chongqing AY730678.1	0.237	0.231	0.230	0.230	0.230	0.230	0.240			
9 中华桃花水母 (象溪) <i>C. sinensis</i> in Xiangxi AY730677.1	0.238	0.233	0.231	0.231	0.231	0.231	0.241	0.003		
10 福泉的桃花水母 <i>Craspedacusta</i> in Fuquan	0.010	0.023	0.025	0.025	0.025	0.025	0.109	0.243	0.244	

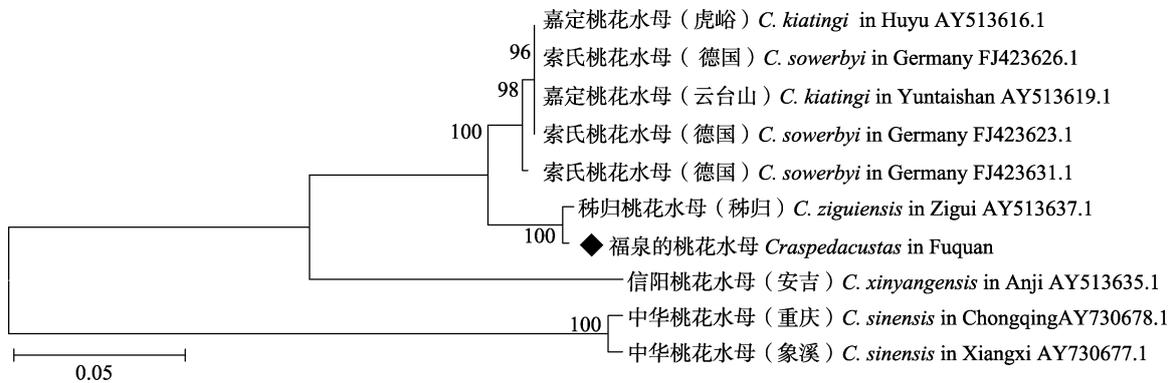


图 7 福泉与其他地区桃花水母的 ITS 区系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree between *Craspedacusta* in Fuquan and other areas' ITS based on neighbor-joining method

菱形标为福泉样品; 各支上数据为 Bootstrap 1 000 给出分支置信度; 标尺刻度表示遗传距离。

The rhombus is the sample in Fuquan; Each data in branch given by Bootstrap 1 000 which means branch credibility; The staff gauge reticle represents the genetic distance.

且在邻接系统进化树中两者聚为一支, Bootstrap 1 000 给出的分支置信度为 100(图 8)。

2.3 物种鉴定结果

结合福泉分布桃花水母的伞径、触手、刺丝囊疣、平衡囊、生殖腺的基本特征, 与已报

道过的 11 个种的桃花水母形态特征相比 (表 5), 从形态学上判断福泉的桃花水母属于索氏桃花水母。通过对样品的 18S rRNA、ITS、COI 序列与 GenBank 上已有的桃花水母序列综合对比, 福泉的桃花水母从分子水平上属于索氏

表 4 基于 COI 区基因建立的不同地区桃花水母的遗传距离

Table 4 Genetic distances between different regions of *Craspedacusta* based on COI

种名 Species						
1 索氏桃花水母 (瑞士) <i>C. sowerbyi</i> in Switzerland MF000493.1						
2 索氏桃花水母 (美国) <i>C. sowerbyi</i> in America LN901194.1	0.244					
3 索氏桃花水母 (湖北) <i>C. sowerbyi</i> in Hubei JN593332.1	0.233	0.024				
4 索氏桃花水母 (意大利) <i>C. sowerbyi</i> in Italy MH230079.1	0.249	0.003	0.027			
5 索氏桃花水母 (希腊) <i>C. sowerbyi</i> in Greece KP231217.1	0.238	0.021	0.009	0.024		
6 索氏桃花水母 (智利) <i>C. sowerbyi</i> in Chile LL01 MF177101.1	0.244	0.000	0.024	0.003	0.021	
7 福泉的桃花水母 <i>Craspedacusta</i> in Fuquan	0.012	0.243	0.233	0.248	0.238	0.243

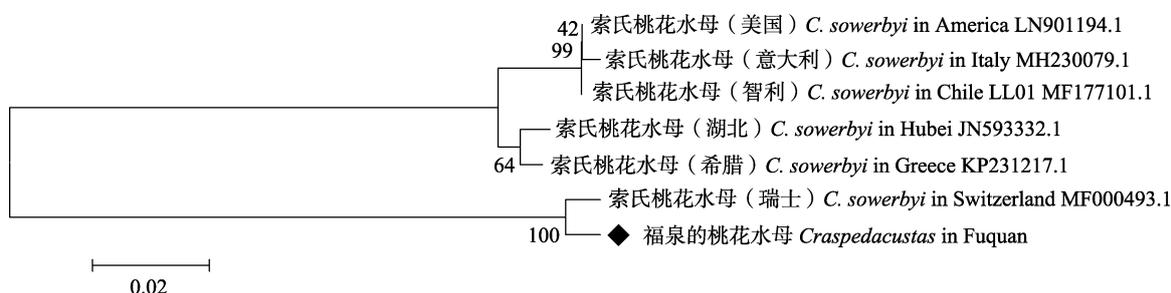


图 8 福泉与其他地区桃花水母的 COI 区系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree between *Craspedacusta* in Fuquan and other areas' COI based on neighbor-joining method

菱形标为福泉样品；各支上数据为 Bootstrap 1 000 给出分支置信度；标尺刻度表示遗传距离。

The rhombus is the sample in Fuquan; Each data in branch given by Bootstrap 1 000 which means branch credibility; The staff gauge reticle represents the genetic distance.

桃花水母。形态学与分子学研究结果相结合，确定贵州福泉的桃花水母在种分类水平上为索氏桃花水母。

3 讨论

3.1 桃花水母的形态学鉴定

3.1.1 桃花水母触手级数确定 福泉的桃花水母触手分 3 级，与已报道的索氏桃花水母(和振武 2005)相同，而与其他报道过的伊氏桃花水母(6 级)、中华桃花水母(4 级)、秭归桃花水母(4 级)(周剑君等 2010)有明显的差别，但关于桃花水母触手分级并没有相关标准规定，且之前研究桃花水母的学者大都只是表达桃花水母有几级触手，并未清晰描述出是怎样来界定触手级数的。

桃花水母触手数多，不同生长阶段的触手数相差很大，有文章记录刚从水螅体释放出的索氏桃花水母的幼水母体的触手数为 8，也有记录为 16，甚至更多的(宋大祥等 2002)。本实验发现的最小桃花水母伞径为 2 mm，其触手数 69，但未分化出明显的 3 级触手，因其触手数多且杂，触手都交织在一起，易混淆，加之研究者的主观描述出入较大，因此本研究给出了本实验界定桃花水母一、二、三级触手的标准，以期能够在触手级数这一形态学指标上更加清晰地鉴定桃花水母。同时图示了本实验对刺丝囊疣、平衡囊、平衡石的形状的判断。

3.1.2 不同伞径差值作为分类学新指标的探讨 桃花水母的伞径作为分类指标之一，被许多学者所采纳，用于分辨桃花水母的种属，但

表 5 福泉的桃花水母与其他 11 个种或亚种、变种的桃花水母形态特征比较

Table 5 Morphological characteristics of *Craspedacusta* in Fuquan and other 11 species of *Craspedacusta*

种类 Species	伞径 (mm) Umbrella diameter	触手级数 Levels of tentacles	触手数目 Number of tentacles	主触手 Main tentacles	刺丝囊疣形状排列 Shape and arrangement of nematocyst warts	平衡囊形状 Shape of statocyst	生殖腺形状颜色 Shape and color of gonad	数据来源 Data sources
福泉的桃花水母 <i>Craspedacusta</i> in Fuquan	12.46	3	260 ~ 453	比其他触手长 Longer than other tentacles	乳头状, 环形排列 Papillate, annular arrangement	管型 Cast	三角囊状和小囊状, 浅绿色 Triangular cysts and vesicles, light green	本文 This study
索氏桃花水母 <i>C. sowerbyi</i>	12	3	200	比其他触手长 Longer than other tentacles	乳头状, 环形排列 Papillate, annular arrangement	管型 Cast	囊状, 褐黄色 Cystiform, tawny	周剑君等 2010
伊势桃花水母 <i>C. iseanum</i>	18	6	128	比其他触手长 Longer than other tentacles	不集成疣, 分散排列 Non-aggregation, scattered arrangement	球型 Spheroidal	扁平叶状 Flat leaf shape	
中华桃花水母 <i>C. sinensis</i>	5 ~ 18	4	136 ~ 217	不比其他触手长 Equal or shorter than other tentacles	细长柱状或棒状, 排列不规则 Slender columnar or rod shaped, irregularly arranged	管型 Cast	小囊状, 褐黄色 Vesicles, tawny	
四川桃花水母 <i>C. sichuanensis</i>	11 ~ 14	4	107 ~ 149	不比其他触手长 Equal or shorter than other tentacles	各环状疣间有明显间隔, 似分节状 annularis, which appears to be segmented	球型 Spheroidal	袋形, 左右褶皱, 微绿色 Baggy, folds on left and right, slightly green	
稀白桃花水母 <i>C. ziguensis</i>	17 ~ 24	4	314 ~ 423	比其他触手长 Longer than other tentacles	球形, 马蹄形 Spherical, horseshoe	管型 Cast	小扁囊状, 左右褶皱, 褐黄色 Small flat cystic shape, folds on left and right, tawny	
楚雄桃花水母 <i>C. chuxiongensis</i>	9 ~ 13	5	256 ~ 273	比其他触手长 Longer than other tentacles	低圆锥状, 排列不规则 Low conical, irregular arrangement	管型 Cast	扁囊状, 左右褶皱, 向下有一细长的指状突起, 淡黄绿色 Flat cystic shape, folds on left and right, yellowish green	
短手桃花水母 <i>C. brevinema</i>	7 ~ 15	4	145 ~ 400	不比其他触手长 Equal or shorter than other tentacles	低圆锥状, 排列不规则 Low conical, irregular arrangement	管型 Cast	囊状, 绿色 Cystiform, green	
信阳桃花水母 <i>C. sowerbyi xinyangensis</i>	6 ~ 12	6	352 ~ 544	比其他触手长 Longer than other tentacles	圆锥形和棒状, 环状排列 Conical and rod shaped, annular arrangement	管型 Cast	三角形囊袋 微绿色 Triangular bag, slightly green	
杭州桃花水母 <i>C. sowerbyi hangzhouensis</i>	6 ~ 13	6	262 ~ 410	比其他触手长 Longer than other tentacles	低圆锥状, 排列不规则 Low conical, irregular arrangement	管型 Cast	带形囊状 粉红色 Band-shaped cysts, pink	
宜昌桃花水母 <i>C. sowerbyi yichangensis</i>	20	7	256	比其他触手长 Longer than other tentacles	乳头状, 排列不规则 Papillate, irregular arrangement	管型 Cast	叶状, 浅绿色 Leafy, light green	和振武 2005
乐山桃花水母 <i>C. sowerbyi leshanensis</i>	5 ~ 22	7	259 ~ 272	比其他触手长 Longer than other tentacles	半球状, 环状排列 hemispherical, annular arrangement	管型 Cast	小囊状, 微绿色 Vesicles, light green	

是对于其不同角度的伞径差值是否能够作为其分类判定标准, 鲜有人讨论。作者在实验中对大量桃花水母活体伞径进行了测量, 发现其伞径 $B_1 - B_2$ 、 $B_3 - B_4$ 普遍比伞径 $A_1 - A_2$ 、 $A_3 - A_4$ 长约 1 mm, 并且随机抽取大小不一的水母的测量结果依旧符合这一发现。此次我们只采集到了贵州福泉的桃花水母, 并没有其他地区的桃花水母样品能够用来做对比分析, 因此这一发现是否能够作为桃花水母形态学上区别物种的新指标, 尚需不同种群和不同种的桃花水母来验证。

3.2 桃花水母的分子鉴定

许多学者都在文章中(苏春分 2009, 周剑君等 2010)提及过形态学鉴定方法易受水母种群、大小、雌雄、生存环境不同的影响, 导致分类学上的标准界定模糊不清, 学者们的主观描述出入较大, 也造成了现在国内桃花水母分类比较混乱的情况, 因此越来越多的学者开始使用不同分子技术来鉴定桃花水母。例如本实验采用的 18S rRNA 序列, 胡义波等(2006a)徐善良等(2010)等学者也曾用于鉴定过桃花水母, 除此之外, 迟艳红等(2016)运用 ITS 区序列、蔡延森等(2014)运用线粒体 COI 序列片段也成功鉴定过桃花水母的种类。

基于 18S rRNA 区建立邻接进化树中, 福泉的桃花水母虽与美国发现的索氏桃花水母聚为一支, 但其分支置信度较低, 为 61, 这可能是由于福泉发现的这一桃花水母种正处于遗传变异的过程当中, 进化尚未结束, 信息位点少, 与其他地区发现的索氏桃花水母之间的进化地位界限比较模糊, 从而导致其虽确定为同一种, 但分支的置信度较低。在进行福泉的桃花水母 COI 区序列对比时, GenBank 中只有 6 条索氏桃花水母的 COI 序列信息, 没有其他种的桃花水母 COI 序列, 说明桃花水母属在 COI 区的遗传序列信息还不是很丰富。在进行 ITS 区序列对比时, 因为 ITS 化速率较快, 核苷酸替换率较高, 碱基变异信息较丰富, 所以福泉发现的桃花水母与秭归桃花水母、索氏桃花水母、乐

山桃花水母的遗传距离都相差不远, 相似度高, 与 18S rRNA 与 COI 的邻接进化树结果不同, 构建的 ITS 区邻接进化树中与秭归桃花水母聚为一支, 因此单 ITS 区分子鉴定结果难以判断福泉的桃花水母到底是哪一种桃花水母, 但结合 18S rRNA 与 COI 分子鉴定结果, 能综合判定福泉的桃花水母样品为索氏桃花水母。在进行序列对比分析时, 如 18S rRNA 和 ITS, 单分子标记的分子鉴定容易出现各种问题, 因此建议在进行桃花水母分子鉴定时, 要尽量选择多种分子标记手段进行综合鉴定, 从多个分子标记水平证实样品的分类地位, 增加可信度, 同时丰富桃花水母这一珍稀生物的基因序列信息。

值得注意的是, 因桃花水母主要以水体中的浮游动物为食, 本实验在桃花水母的垂管与消化腔中观察到了轮虫(Rotifer)、枝角类(Cladocera)、桡足类(Copepods)等浮游生物, 消化腔或垂管中残留的食物可能会干扰分子鉴定结果, 因此在进行桃花水母分子鉴定时, 需去除其消化腔、垂管等伞体以外的结构, 尽量降低提取 DNA 时不属于水母的其他生物对其 DNA 纯度的影响。因桃花水母体内 99%都是水分, 在进行 DNA 提取时, 除去水分以后不足之前体积的 1%, 所以桃花水母的分子鉴定需要 10 个以上的样品进行 DNA 的提取, 以保证能够成功提取出 DNA, 这一点在邹秀等(2012)、迟艳红等(2016)的实验中也有提及, 上述研究分别采用 7 只、10 只桃花水母样品提取 DNA。

参 考 文 献

- Medlin L, Elwood H J, Stickel S, et al. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2): 491-499.
- 蔡延森, 刘芹, 王译伟, 等. 2014. 四川宜宾产桃花水母的线粒体 COI 序列片段分析. *西南医科大学学报*, 37(1): 79-82.
- 岑戈潜. 2004. 贵州省独山县大黑寨水库惊现桃花水母. *水利渔业*, (3): 16.

- 迟艳红, 陈华增, 杨翠华, 等. 2016. 桃花水母的核糖体 RNA 基因 ITS 区序列分析及物种鉴定. *海洋科学*, 40(2): 35–40.
- 和振武. 2005. 中国桃花水母属的研究. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 33(1): 100–105.
- 胡义波. 2005. 浙江索氏桃花水母的生物学及遗传分析. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 44–46.
- 胡义波, 姜乃澄. 2006a. 浙江两地产索氏桃花水母核糖体小亚基 rRNA 基因序列分析. *浙江大学学报: 理学版*, 33(5): 559–566.
- 胡义波, 姜乃澄, 王玥, 等. 2006b. 浙江产索氏桃花水母的形态学及参数分析. *浙江大学学报: 理学版*, 33(6): 682–687.
- 梁正其, 姚俊杰, 王艳艳, 等. 2011. 贵阳市百花湖桃花水母的外部形态及运动特征. *广东农业科学*, 38(12): 125–127.
- 宁平. 2012. 中国金线鱼科鱼类分类、系统发育及动物地理学研究. 北京: 中国科学院动物研究所博士学位论文, 92.
- 宋大祥, 张超, 吴岷. 2002. 桃花水母. *生物学通报*, 37(10): 1–3.
- 苏春分, 王丹丽. 2009. 桃花水母的分类研究. *水产科学*, 28(3): 167–170.
- 万辛如, 吴小平, 欧阳珊. 2013. 桃花水母分类、分布及江西桃花水母形态观察. *湖北农业科学*, 52(16): 3767–3777.
- 徐善良, 周剑君, 王丹丽, 等. 2010. 浙江省桃花水母 18s rRNA 基因序列分析及物种鉴定. *淡水渔业*, 40(2): 14–18.
- 周剑君, 王丹丽, 徐善良, 等. 2010. 浙江省 7 个地点桃花水母的形态学分类研究. *宁波大学学报: 理工版*, 23(1): 18–22.
- 邹秀, 王丹丽, 徐善良, 等. 2012. 浙江 4 地桃花水母的 rDNA-ITS 序列分析. *生物学杂志*, 29(3): 6–10.