

广西地区文蛤的遗传多样性研究*

阎冰¹ 邓岳文² 杜晓东² 兰国宝¹ 王爱民¹¹ 广西壮族自治区海洋研究所 北海 536007)² 湛江海洋大学水产学院 524025)

摘要 以随机扩增多态性 DNA(RAPD) 研究广西的山口、北海、犀牛角、东兴的文蛤种群的遗传多样性。结果表明,在筛选的 60 个引物中,23 个呈阳性反应,其中 10 个引物可产生 105 条稳定、清晰的带。山口、北海、犀牛角、东兴的文蛤种群的遗传多样性指数分别为 0.199 5,0.203 9,0.177 3,0.193 6;多态位点比例分别为 86.32%,90.63%,81.05%,88.00%;4 个种群间的遗传距离在 0.050~0.070 之间,相邻种群的遗传差距较小。除犀牛角种群以外,其它 3 个种群的遗传变异水平较高。

关键词 文蛤, 种群, 遗传多样性, RAPD 标记

文蛤(*Meretrix meretrix*)俗称车螺、花蛤、黄蛤、海蛤,属帘蛤科(Veneridae)、文蛤属(*Meretrix*),呈卵三角形的双壳贝类。文蛤的地理分布较广,日本、朝鲜、中国沿海分布较多,我国自南到北都有文蛤的足迹。文蛤是蛤中上品,素有“天下第一鲜”的盛誉。文蛤的增养殖是一项投资省、风险小、见效快、效益高的海养殖业,因此,近 10 几年来,文蛤的增养殖得到了蓬勃的发展。但是在国内外,大都只是注重文蛤的增养殖,对文蛤的遗传结构知之甚少,与该品种的增养殖业的可持续发展很不适应。因此,作者选取广西的山口、北海、犀牛角、东兴 4 个不同地理位置的文蛤,以随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 分子标记来了解这些种群的遗传特性,以期为该品种的遗传育种、良种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的材料来源于广西的山口、北海、犀牛角、东兴。材料均为活体,带回实验室后取材。

1.2 DNA 提取

每个个体取闭壳肌 0.2 g,剪碎,然后加入 500 μ l 裂解液 [10 mmol Tris-HCl (pH 8.20), 1 mmol EDTA-Na, 400 mmol NaCl, 1% SDS, 100 mg/L 蛋白酶 K],充分混匀后,然后在 55 $^{\circ}$ C 过夜,变清的样品加 250 μ l 饱和 NaCl 溶液,室温 800 r/min 离心 20 min。上清液加等体积的异丙醇,混匀, -20 $^{\circ}$ C 下处理 30 min,14 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 70% 的乙醇洗涤,去乙醇,加 500

μ l TE(10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA)。溶液中加入 10 μ g RNase A,37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。然后加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取 10 min,上清液用氯仿:异戊醇(24:1)提取 10 min。上清液加入 2.5 倍体积无水乙醇沉淀至少 2 h,12 000 r/min 离心 10 min,取沉淀,70% 的乙醇洗涤,室温干燥,加入 200 μ l TE(10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA)。样品用紫外分光光度计检测含量与纯度。

1.3 PCR 反应

随机引物、Taq DNA 酶(配有缓冲液、 $MgCl_2$ 溶液)和 dNTPs 从华美生物公司订购,其中引物的编号分别为 8 201~8 220,8 641~8 660,8 741~8 760。反应混合液 25 μ l 含 10 mmol Tris-HCl (pH 9.0),50 mmol KCl,2.5 mmol $MgCl_2$,0.001% 明胶,dNTP 每种 0.1 mmol,引物 15 ng,基因组 DNA 25 ng,1 U Taq DNA 聚合酶。珠海黑马医学仪器有限公司的 Hema 扩增仪扩增,共 40 个循环:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C,36 $^{\circ}$ C 各 1 min;72 $^{\circ}$ C,2 min,最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。扩增产物用 1.4% 琼脂糖胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)电泳分离,紫外透射仪观察并摄影。

1.4 数据处理

* 广西壮族自治区青年基金资助项目 9912003 号
第一作者:阎冰,出生于 1966 年,硕士,副研究员,从事海洋生物技术研究。E-mail:gxmbc@ppp.nn.gx.cn

收稿日期:2001-10-15;修回日期:2002-03-20

群体间遗传相似性和遗传距离的计算如下: $F = 2X_{ab} / (X_a + X_b)$, $D = 1 - F$, 其中 X_{ab} 为种群 a 和种群 b 的共享位点, X_a 和 X_b 分别为种群 a 和种群 b 的位点总数; 遗传多样性指数: $H = -\sum x_i \ln x_i / N$, x_i 为位点在某种群中出现的频率, N 为在该种群中检测到的位点总数; 多态位点的比例: 多态性 = (总带数 - 共有带数) / 总带数, 总带数指所有的扩增片段数, 共有带数是指所研究的种群共有的带数。

2 结果

用 60 种引物进行筛选, 其中 23 种引物呈阳性反应, 10 种引物 (见表 1) 可产生清晰、可重复的扩增带。用这 10 种引物对 4 个种群进行 PCR 扩增, 共得到 105 条带 (见表 1), 大部分扩增片段的大小在 125 ~ 2027 bp 之间。图 1 是引物 8 207, 8 756 对 4 个群体样品扩增产物的电泳图。把实验数据进行统计分析, 得到的结果见表 2、表 3。

3 讨论

RAPD 是以 10 碱基的任意序列寡核苷酸片段

表 1 RAPD-PCR 反应所用的引物、扩增带数以及在 4 个种群的扩增片段数

Tab. 1 Prime sequences used and the amplified bands of the different primes and the numbers of amplified fragments of the four populations

引物	序列(5'-3')	扩增带数	扩增片段数			
			山口	北海	犀牛角	东兴
8 207	TCCGATGCTG	8	25	22	17	24
8 652	CAGTGCTGTG	10~13	14	28	25	41
8 653	GTCAGAGTCC	8~10	20	22	25	22
8 659	GGTGACGTT	7	24	22	29	23
8 660	ACACACGCTG	12	42	36	42	37
8 742	TCGGACGTGA	6~9	13	14	19	22
8 747	CTGCATCGTG	8~9	29	22	21	24
8 752	ACGCGCATGT	11~12	38	39	35	39
8 756	TCTCAGCTGG	11~13	32	19	21	25
8 758	GAATCGGCCA	11~12	35	32	35	33

表 2 文蛤 4 个种群的遗传距离

Tab. 2 Genetic distances of the four populations of *Meretrix meretrix*

位置	遗传距离			
	山口	北海	犀牛角	东兴
山口	0.0000			
北海	0.0576	0.0000		
犀牛角	0.0632	0.0511	0.0000	
东兴	0.0667	0.0681	0.0714	0.0000

表 3 遗传多态与多态位点比例在文蛤 4 个种群的分布

Tab. 3 Partitioning of genetic diversity and the rate of polymorphic loci within and between the four populations of *Meretrix meretrix*

位置	遗传多样性指数(H_0)	多态位点比例(%)
山口	0.1995	86.32
北海	0.2039	90.63
犀牛角	0.1773	81.05
东兴	0.1936	88.00

为引物, 对末位知序列的基因组 DNA 进行随机的 PCR 扩增, 扩增产物的多态性反应了基因组 DNA 相应区域的多态性。因其具有操作简单、能够快速有效地提供基因组 DNA 的多态性数据等优点, 所以自从 Williams 等 1990 年建立 RAPD 技术以来, 被广泛应用于种群间、种间遗传关系的研究, 构建遗传图谱, 基因定位与分离^[1-3]。

有关 RAPD 在软体动物的应用的报道较少^[4-6,8], 但本研究的结果表明, 该技术可检测到基因组 DNA 丰富的遗传多态性。本研究所用的 10 个引物中, 每个引物可产生 6~13 条带, 平均每种引物每个个体扩增出 5.57 条带, 同种引物对不同种群的扩增片段数量的差异也比较明显, 例如, 引物 8 652 对山口种群的扩增片段为 14 条, 而对北海种群的扩增片段为 41 条。

Thorpe 提出种群间的遗传距离是 0.030~0.200, 从本研究的结果来看, 这 4 个种群的

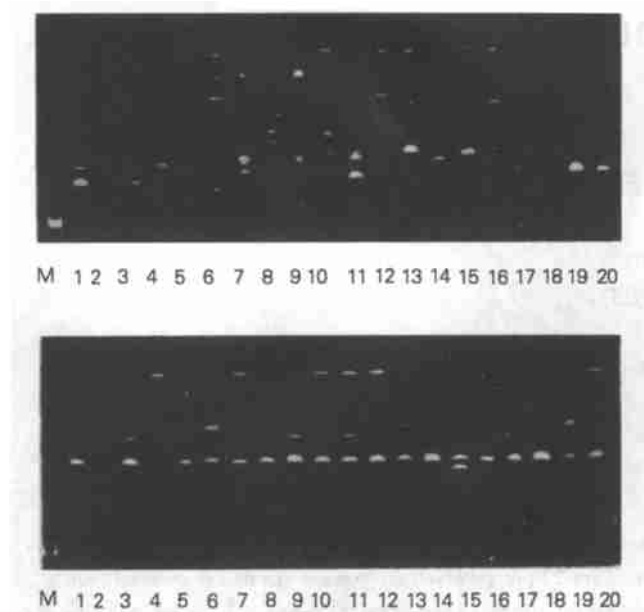


图1 引物 8 756 和 8 207 的扩增电泳
从左至右: 东兴种群 (1~5 道); 犀牛角种群 (6~10 道); 北海种群 (11~15 道); 山口种群 (16~20 道)。M 为分子量标记 λ DNA / Hind III - EcoR I。

Fig. 3 Amplified band patterns of 20 individuals by primers 8 207 and 8 756
From left to right: Dongxing population (1~5 lanes); Xiniujiang population (6~10 lanes); Beihai population (11~15 lanes); Shankou population (16~20 lanes); M: marker λ DNA / Hind III - EcoR I.

的遗传距离在 0.050~0.070 之间, 没有超出这个范围。从地理位置来看, 山口到北海、犀牛角、东兴的距离逐渐增大, 而结果表明了相邻两地理位置种群的遗传距离偏小, 地理相隔越远, 遗传距离越大。刘必谦 1998 年在研究大连湾牡蛎种群的遗传多样性时, 曾报道过这种类似的结果, 并且分析了原因^[4]。鉴于本研究所选取文蛤种群的地理位置相隔较近, 没有地理隔离, 文蛤有浮游幼虫发育阶段, 各地的气候条件变化较小等因素, 因此造成这种现象的原因可能是相邻地理位置的种群存在着基因的交流。

近年来, 为了使研究的结果具有可比性, 在植物的遗传多样性研究中引入了香农遗传多样性指数, 因这个指数没有考虑到所测定的位点总数, 而具有一定

的局限性。在进行本研究的数据分析时, 作者采用张四明等 2001 年介绍的方法, 考虑了所测定的位点总数。由于有关贝类的 RAPD 的资料很少, 而且没有进行遗传多样性指数的分析, 因此就本实验的数据很难有直观的横向比较。多态位点的比例也常是评价遗传多样性的指标, 兰宏等 1996 年研究滇金丝猴的 RAPD 遗传多样性的结果表明, 20 % 的 RAPD 标记为多态, 个体的遗传距离为 0.052, 并且得出了遗传多样性低的结论。张四明等 2001 年研究中华鲟的遗传结构的结果显示 11.1 % 的座位为多态, 遗传距离为 0.027, 因而认为中华鲟核基因组遗传变异较低, 并且这个结果得到了反映核基因遗传变异的蛋白质电泳研究的证实^[7]。从本研究的结果来看, 文蛤种群内的多态位点比例为 80 %~90 % 之间, 因此作者初步认为除犀牛角种群的遗传变异略低外, 其它 3 个文蛤种群的遗传变异较高。

参考文献

- 1 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001, 30~51
- 2 刘萍. DNA 标记技术在海洋生物种质资源开发和保护中的应用, 中国水产科学, 2000, 7 (2): 86~89
- 3 权洁霞. 海洋生物多样性研究现状, 青岛海洋大学学报, 1999, 29(2): 283~288
- 4 刘必谦, 戴继勋等. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用, 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 82~87
- 5 杜晓东, 叶富良等. 合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 基因组 DNA 多态性的研究, 湛江海洋大学学报, 2000, 20(2): 97~98
- 6 王爱民, 邓凤娇等. 马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析, 武汉大学学报, 2000, 46(4): 467~470
- 7 张四明, 邓怀等. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究, 海洋与湖沼, 2001, 31(1): 1~6
- 8 Langand J. A. et al. Population structure of *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Guadeloupe Island, using RAPD markers, J. Mollus. Stud., 1999, 65: 425~433

A STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF *Meretrix meretrix* BY RAPD

YAN Bing¹ DENG Yue-wen² DU Xiao-dong² LAN GUO-bao¹ Wang Ai-min¹

(¹ Guangxi Institute of Oceanography, Beihai, 536007)

(² Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, 524025)

Received: Oct., 15, 2001

Key Word: *Meretrix meretrix*, Populations, Genetic diversity, RAPD

Abstract

Genetic diversity analysis for four populations of *Meretrix* respectively from Shankou, Beihai, Xiniujiao, Dongxing was conducted by Random Amplified Polymorphic DNA. There are 23 primes which are positive among 60 screened primes. Totally 105 bands which are stable and clear, are produced by the 10 primes among the 23 primes. The index of the genetic diversity is 0.199 5(Shankou), 0.203 9(Beihai), 0.177 3(Xiniujiao), 0.193 6(Dongxing) respectively; The rate of polymorphic locus is 86.32% in Shankou population, 90.63% in Beihai population, 81.05% in Xiniujiao population, 88.00% in Dongxing population. Genetic distances of the four populations are about 0.050 ~ 0.070. Except Xiniujiao population, the other three populations have a high level of genetic variance. (本文编辑:李本川)