

海南岛大珠母贝遗传多样性分析

苏天凤, 朱彩艳, 江世贵

(中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 利用 RAPD 技术首次对中国海南岛环岛的大珠母贝 (*Pinctada maxima* Jameson) 遗传多样性进行分析。从 20 条 10bp 引物中选取 7 条引物用于群体遗传多样性分析, 共检测出 22 个位点, 其中 11 个位点(占 50%)显多态性, Shannon 多样性值为 0.117。用非加权配对算数平均法(UPGMA)聚类分析的结果: 12 个个体间遗传相似系数最大为 1.000, 最小为 0.706, 平均遗传相似系数为 0.8438。表明海南岛大珠母贝群体间遗传多样性不一, 遗传分化较大, 因此很有必要对遗传多样性水平较高的种群, 划定保护范围加以重点保护, 以扩大和恢复大珠母贝的种质资源。

关键词: 大珠母贝 [*Pinctada maxima* (Jameson)]; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)08-0020-03

大珠母贝 (*Pinctada maxima* Jameson) 俗名白蝶贝, 是珍珠贝中个体最大的一种, 为国家二级保护动物^[1]。我国仅分布于广东省的雷州半岛和海南岛等亚热带和热带海域^[2,3]。自 20 世纪 80 年代以来, 大珠母贝野生资源日渐稀少, 已濒临绝种的危险^[4]。为了有效地保护这种濒危动物, 全面了解大珠母贝的种群结构及其遗传多样性的分布是十分必要和迫切的。

作者利用 RAPD 技术初步分析了海南岛环岛大珠母贝的遗传多样性和遗传变异, 以期对大珠母贝种群的保护、恢复和育种提供有效的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大珠母贝分别采于海南岛环岛, 作者从 1999 年开始收集, 至 2003 年收集了 4 次, 共 12 个个体, 收集来的个体存放于-72 超低温冰箱。避免计算 DNA 谱带时人为的误差, 将 12 个个体打乱分别编为 1~12 号。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用杭州维特洁生化技术有限公司生产的动/植物组织细胞基因组 DNA 小量纯化试剂盒, 按照说明提取基因组 DNA, 所获 DNA 稀释 10 倍后用于扩增。

1.2.2 RAPD 反应体系

10 碱基随机引物购自上海生物工程有限公司, dNTPs 和 TaqDNA 聚合酶及缓冲液购自上海申能博彩, PCR 仪为德国 BIO-metra 公司生产的 UNO-Thermoblock 型。反应总体积为 25 μ L; 其中 10 $\times$ buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, Taq 0.2 μ L (5U/ μ L), dNTPs (2.5m mol/L) 0.5 μ L, 引物 (10p mol/L) 2 μ L, 模板 (约 25ng) 1 μ L, 最后用超纯水补齐 25 μ L。反应程序为: 94 预变性 5min 后延

行 45 个循环: 94 45s, 36 45s, 72 90s, 最后 72 延伸 8 min。扩增产物在质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 (0.5 $\times$ TBE, 4V/cm 恒稳电压), 溴化乙锭染色, 采用英国 Syngene 公司的 GenGenius 全自动凝胶成像分析系统照像。分子量 Marker 为 DL2000, 购自大连宝生物工程有限公司。

1.2.3 数据分析

统计 12 个个体扩增的 RAPD 带谱, 每条 DNA 带谱作为一个统计单位, 有带者记为 1, 无带者记为 0。根据 Apostol 等^[5]假设, 将 RAPD 标记作为等位基因进行多态分析, 多态位点比例 p = 多态扩增片段/扩增片段总数。任意 2 个个体间的遗传相似性和遗传距离根据 Lynch^[6]的公式计算: $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, S 为遗传相似性; $P = 1 - S$, P 为遗传距离。其中: N_{xy} 为个体 X 和 Y 共同拥有的带数; N_x 和 N_y 分别为个体 X 和 Y 所具有的扩增带数。根据遗传距离, 对每一个体进行聚类分析。Shannon 多样性值根据 $H = -\sum \pi_i \ln \pi_i / N$ 计算^[7], π_i 为某一条带在种群中出现的频率, N 为总带数。

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 扩增结果及扩增图谱

采用上海生物工程有限公司编号的 S1~S20 和 S341~S360 共 40 条引物进行引物筛选, 能扩增出清晰稳定带谱的共 7 条引物 (表 1)。这 7 条引物共扩增出 22 条清晰的带谱, 平均每个引物扩增出 3.7 条带。其中 S11 扩增的为单态引物, 其余为多态引

收稿日期: 2005-04-06; 修回日期: 2005-05-31

基金项目: 国家科技基础性工作项目 (2000DEA30014)

作者简介: 苏天凤 (1969-), 女, 副研究员, 从事渔业生物技术研究, E-mail: lu5555@sohu.com

物，引物 S11 和 S357 的扩增结果见图 1。

表 1 7 条随机引物的 DNA 序列及其扩增结果

Tab.1 The sequences and amplified results of 7 random

primers			
引物	序列	扩增位点数	多态位点数
S4	GGACTGGAGT	4	3
S10	CTGCTGGGAC	4	2
S11	GTAGACCCGT	2	0
S13	TTCCCCCGCT	2	2
S344	CCGAACACGG	3	1
S347	CCTCTCGACA	3	1
S357	ACGCCAGTTC	4	2

2.2 数据分析结果

根据 $p = \text{多态性扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$ 和 $H = -\sum \pi_i \ln \pi_i / N$ ，计算出海南岛环岛大珠母贝个体多态性位点比例为 50.00%，Shannon 多样性值为 0.117。12 个个体间相似性系数及相对遗传距离见表 2。大珠母贝遗传相似系数为 0.706~1.000，

平均为 0.844。遗传距离为 0.000~0.294，平均为 0.156。以上数据说明海南岛大珠母贝个体间遗传分化较大。

3 讨论

作者首次利用 RAPD 技术对海南岛大珠母贝群体进行了遗传结构和遗传多样性大小的探讨。由分析结果来看，大珠母贝个体间遗传分化较为明显，12 个个体中遗传距离最小的为 0.000，最大为 0.294，说明在海南岛环岛某一地理区域的大珠母贝遗传多样性已经丧失了很多，而在另外一些区域其种群仍具有一定的遗传多样性，但由于采样的个体数不够多，它们是否真正代表其种群多样性要打一个折扣。由于本研究收集的大珠母贝渠道不明，所以作者未能明确遗传多样性较大的样本分布在哪一区域，作者的分析只能是抛砖引玉，作为一种极有经济价值的贝类，很有必要对其遗传结构及遗传变异作进一步全面的分析，在弄清大珠母贝遗传结构的前提下，寻找遗传多样性水平较高的种群，划定保护范围加以重点保护，防止近交衰退，加强对大珠母贝种质资源的保护，加快大珠母贝种质资源的恢复进程。

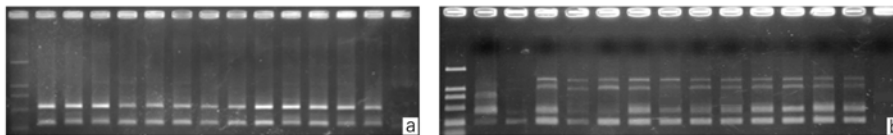


图 1 引物 S11(a)和 S357(b)的扩增图谱

Fig.1 Amplified bands of primer S11(a) and S357(b)

表 2 12 个大珠母贝个体间的遗传相似性系数和相对遗传距离

Tab.2 Genetic similarity indices and relative genetic among of 12 *Pinctada maxima*

个体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	—	0.212	0.135	0.111	0.176	0.143	0.143	0.081	0.111	0.294	0.125	0.250
2	0.788	—	0.111	0.086	0.030	0.059	0.118	0.111	0.086	0.125	0.226	0.226
3	0.865	0.889	—	0.026	0.081	0.053	0.053	0.000	0.026	0.062	0.143	0.257
4	0.889	0.914	0.974	—	0.056	0.081	0.027	0.026	0.000	0.143	0.118	0.235
5	0.824	0.970	0.919	0.944	—	0.029	0.086	0.081	0.056	0.091	0.188	0.187
6	0.857	0.941	0.947	0.919	0.971	—	0.111	0.053	0.081	0.118	0.212	0.212
7	0.857	0.882	0.947	0.973	0.914	0.889	—	0.053	0.027	0.118	0.091	0.212
8	0.919	0.890	1.00	0.974	0.919	0.947	0.947	—	0.026	0.111	0.143	0.257
9	0.889	0.914	0.974	1.000	0.944	0.919	0.973	0.974	—	0.143	0.118	0.235
10	0.706	0.875	0.938	0.857	0.909	0.882	0.882	0.889	0.857	—	0.161	0.097
11	0.875	0.774	0.857	0.882	0.813	0.788	0.909	0.857	0.882	0.839	—	0.133
12	0.750	0.774	0.743	0.765	0.813	0.788	0.788	0.743	0.765	0.903	0.867	—

注：数字矩阵对角线下的数据表示遗传相似性系数，数字矩阵对角线上的数据表示遗传距离。

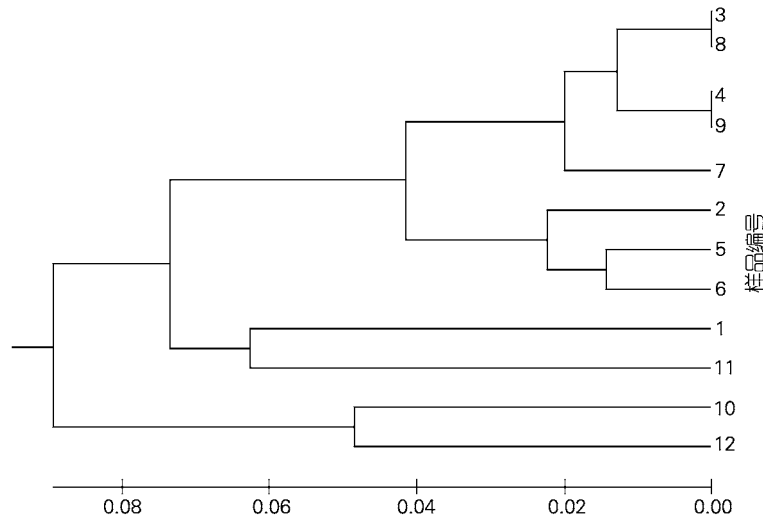


图 2 用 UPGMA 法构建的大珠母贝亲缘关系图

Fig.2 Relationships among 12 *Pinctada maxima* based on UPGMA methods

根据所得的遗传相似性系数和相对遗传距离采用 UPGMA 法对相对遗传距离进行聚类分析, 构建大珠母贝的亲缘关系 (图 2)。

参考文献:

- [1] 喻达辉,汪亚平,吴开畅,等.大珠母贝基因转移的电击参数[J].水产学报,2001,25(5):408-412.
- [2] 蒙钊美,李有宁,邢孔武.珍珠养殖理论与技术[M].北京:科学技术出版社,1996.34-35.
- [3] 谢玉坎,林碧萍,张偲,等.大珠母贝及其养殖珍珠[M].北京:海洋出版社,1990.5-8.
- [4] 林福申主编.中国名贵珍稀水生动物[C].杭州:浙江科学技术出版社,1987.9-10.
- [5] Apostol B L, Black IV W C, Reiter P, *et al.* Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico[J]. *Heredity*, 1996, 76:325-334.
- [6] Lynch M.. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. *Mol Biol Evol*,1990, 7:478-484.
- [7] Wachirs F N, Waugh R, Hackett C A. Detection of genetic in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD makers[J].*Genome*, 1995,38:201-210

Genetic diversity of *Pinctada maxima*(Jameson) germplasm by RAPD analysis

SU Tian-feng, ZHU Cai-yan, JIANG Shi-gui

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Received : Apr. , 6,2005

Key words: *Pinctada maxima*(Jameson); RAPD; genetic diversity

Abstract: Genetic diversity of *Pinctada maxima* germplasm from Hainan Islands was studied by RAPD for the first time. Among total 20 10pb primers, 7 were selected for group genetic diversity research. 22 DNA fragments were recognized, in which 11 were polymorphic. The Shannon Index of diversity of *P. maxima* population was 0.1172. The genetic similarities varied between 1 and 0.706, indicating that the genetic diversities of *P. maxima* inside the population were obviously different from each other. In order to resume the quality of *P. maxima* strain, measures must be taken to protect population of *P. maxima* that are more polymorphic. (本文编辑: 张培新)