

西施舌群体遗传结构及分化的 RAPD 分析

孟学平¹, 王帅², 高如承², 申欣¹, 程汉良¹, 田美¹

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350108)

摘要: 采用 55 个随机引物对西施舌(*Coelomacra antiquata*)5 个群体, 即长乐(CL)、启东(QD)、连云港(LYG)、胶南(JN)和北海(BH)群体进行 RAPD 扩增。用 PopGen(Version1.32)软件进行遗传多样性分析。结果共筛选出 12 个重复性好的引物, 得到 88 条清晰稳定的条带, 扩增片段在 100 bp~3 000 bp 之间, 其中引物 S299 扩增的 600 bp 片段为长乐群体特有。多态位点比例为 62.07%~78.26%(JN、LYG、BH、QD、CL 群体分别为 78.26%、77.05%、72.58%、70.05%、62.07%), Shannon 指数为 0.210 5~0.312 3。群体间遗传距离为 0.068 3~0.223 9, 其中长乐群体与其余 4 个群体间的遗传距离为 0.182 7~0.223 9, 4 个非长乐群体的遗传距离为 0.068 3~0.136 7。群体间遗传分化系数(F_{st})为 0.313 01($P < 0.05$), 表明在整个遗传变异中群体间占 31.30%。CL 群体与 QD、BH、JN、LYG 群体间的遗传分化系数(G_{st})分别为 0.364 9, 0.344 8, 0.325 0, 0.309 0; 而非长乐群体之间的遗传分化系数为 0.148 2~0.240 3; 以上数据显示长乐群体遗传分化最大。聚类结果显示, 启东和胶南群体首先聚为一支, 然后与北海群体聚在一起, 再和连云港群体相聚; 而长乐群体则单独形成一支。

关键词: 西施舌(*Coelomacra antiquata*); 遗传结构; RAPD

中图分类号: Q951^{+.3}

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)02-0006-04

西施舌(*Coelomacra antiquata*)为浅海埋栖性双壳贝类, 隶属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroidea)、蛤蜊科(Mactridae)。西施舌自然分布于太平洋西部的日本、朝鲜、韩国及中国沿海和印度半岛。我国南北沿海均有分布。西施舌营养价值高^[1], 养殖前景看好。近 10 多年来, 由于需求量的不断增加, 各种掠夺性的捕捞和环境污染, 使西施舌产量逐年减少^[2-3]。为了保护开发这种名贵贝类, 自 20 世纪 60 年代起, 国内学者便开始对西施舌的生物学^[4]、人工育苗^[5]等进行了研究。近年来, 群体遗传差异研究报道日渐增多^[6-10], 但全国西施舌总体遗传关系尚不明朗。且目前报道的核苷酸多态性研究结果不能解析大多数群体间的差异。随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)分析技术已广泛应用于水产动物的遗传背景研究^[11-13]。本研究用 RAPD 分子标记分析我国 5 个自然群体西施舌遗传差异, 对存在的争议作深入研究, 进一步揭示西施舌群体间的遗传差异, 为其遗传多样性分析、种质鉴定及其资源保护和利用提供核基因组 DNA 资料。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

实验样本于 2004 年 10 月至 2007 年 5 月分别采

自山东胶南(JN)、江苏连云港(LYG)、启东(QD)、福建长乐(CL)、广西北海(BH)5 海区的野生西施舌。取闭壳肌浸于 75%乙醇中, 4°C 保存备用, 每个群体 30 个样本。

DNA 提取试剂、Taq 酶(BBI)等 PCR 试剂购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 DNA 提取及浓度检测

将酒精浸泡的西施舌闭壳肌(或斧足), 洗涤除去乙醇吸干表面水分, 称取 50~100 mg, 剪碎, CTAB 裂解液加蛋白酶 K 裂解, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, TE 缓冲液溶解。DNA 经电泳检测, 用核酸蛋白检测仪测定浓度后备用。

1.3 PCR 扩增

实验所用的 12 个随机引物从生工生物工程(上海)有限公司合成的 55 个引物中筛选得到, 引物编号及其序列列表 1。

收稿日期: 2009-11-18; 修回日期: 2010-04-13

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2007066); 国家 863 计划项目(2004AA603140); 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题(2005HS009, 2009SH13); 江苏省教育厅自然科学基金项目(05SJD240028)
作者简介: 孟学平(1955-), 男, 硕士, 内蒙古商都县人, 教授, 主要从事水生生物生化及分子生物学研究, E-mail: mxp2002@hotmail.com, 电话: 0518-85890806

PCR 反应总体积 25 μ L, 其中含 10 \times Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L, Taq 酶 1.0 U, 50 ng 模板。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后进入 PCR 循环, 即: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共进行 40 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, GoldView 染色, 凝胶成像系统观察并拍照。

表 1 随机引物及其序列

Tab. 1 RAPD primers and sequences

引物编号	引物序列
S82	GGCACTGAGG
S83	GAGCCCTCCA
S104	GGAAGTCGCC
S1065	GATGGCAGTC
S2007	GGGTCGCATC
S1290	ACCCCTGGCA
S1020	GGAAGGTGAG
S29	AGTCAGCCAC
S2138	TGGCGCTGGT
S299	TGAGGGTCCC
S12	CCTTGACGCA
S119	CTGACCAGCC

1.4 数据处理

电泳结果按照条带的有无转化为 1, 0 矩阵: 将电泳图谱中每一条带的迁移位置记作一个位点, 当相同迁移位置的扩增带出现时记为 1, 缺失记为 0。将 1, 0 谱带矩阵输入 PopGen(Version1.32)^[14]软件进

行 Hardy-Weinberg 平衡定律检验(卡方检验)、计算群体多态位点率、Shannon 信息指数、 G_{st} 等相关参数及进行聚类分析。用 Arlequin 3.1 软件进行分子方差分析(AMOVA)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

从供试的 55 个随机引物中筛选出条带清晰、稳定、分布合理、重复性好、个体或群体特异性引物 12 个, 共扩增出 88 个条带, 扩增产物分子量为 100~3000 bp。其中引物 S299 扩增效果好, 能将长乐与其他群体分开。长乐群体多数个体有特征带。部分 RAPD 图谱见图 1。

2.2 遗传多样性分析

西施舌 5 个群体的多态位点百分率在 62.07%~78.26%之间, Shannon's 信息指数 G_{st} 为 0.2105~0.3123, 其中 CL 群体两个多样性指数最低, JN 群体最高(表 2)。

群体间的遗传距离显示(表 3), 长乐群体与其余 4 个群体间的遗传距离为 0.182 7~0.223 9, 遗传相似度为 0.799 4~0.833 0; 而非长乐的 4 个群体的遗传距离为 0.068 3~0.136 7, 遗传相似度为 0.872 2~0.934 0。这表明长乐群体和其他群体的亲缘关系相对远。

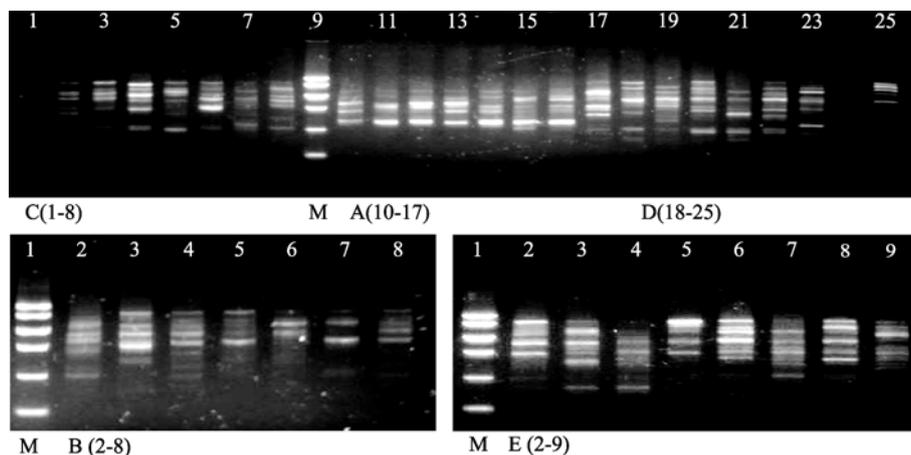


图 1 引物 S299 对西施舌不同地理群体的 RAPD 扩增结果

Fig. 1 PCR results of five stocks of *Coelomactra antiquata* using primer S299

A: CL 群体; B: BH 群体; C: QD 群体; D: JN 群体; E: LYG 群体; M 标准分子量 DNA

A: CL stock; B: BH stock; C: QD stock; D: JN stock; E: LYG stock; DNA Marker

AMOVA 分析结果(表 4)显示: 群体间遗传分化系数 $F_{st}=0.313 01(P<0.05)$, 表明在整个遗传变

异中群体间占 31.30%, 遗传分化大部分来自群体内。由表 5 可知, CL 群体与 QD, BH, JN, LYG 群

表 2 西施舌群体遗传多样性

Tab. 2 Genetic diversity of *C. antiquata*

群体	位点数	多态位 点数	多态位点 比例(%)	香农多样 性指数
QD	67	47	70.15	0.2612
BH	62	45	72.58	0.2782
CL	58	36	62.07	0.2105
JN	69	54	78.26	0.3123
LYG	61	47	77.05	0.2887

体间的遗传分化值分别为 0.364 9, 0.344 8, 0.325 0, 0.309 0; 而 QD, BH, JN, LYG 4 个群体之间的 G_{st}

值为 0.148 2~0.240 3; 以上数据显示长乐群体和其他群体间的遗传分化最大, 群体间的基因流(N_m)同样呈这一趋势。

2.3 聚类分析

用 Popgen(Version1.3.1)软件构建 5 个西施舌群体的 UPGMA 系统进化树。由图 2 可见启东和胶南群体首先聚为一支, 然后与北海群体聚在一起, 再和连云港群体相聚; 而长乐群体则单独形成一支。聚类结果显示北部湾(BH)群体与黄海(QD、JN、LYG)群体亲缘关系近, 与东海群体(CL)亲缘关系远, 其演化关系不规律。

表 3 西施舌群体间遗传距离(下三角)及遗传相似性指数(上三角)

Tab. 3 Genetic distances and identities of *Coelomastra antiquata* stocks

群体	QD	BH	CL	JN	LYG
QD	—	0.916 8	0.799 4	0.934 0	0.872 2
BH	0.086 9	—	0.805 8	0.884 4	0.900 3
CL	0.223 9	0.216 0	—	0.810 9	0.833 0
JN	0.068 3	0.122 9	0.209 6	—	0.908 1
LYG	0.136 7	0.105 1	0.182 7	0.096 4	—

表 4 群体间分子变异分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) among stocks

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例
群体间	4	192.700	4.725 45	31.30
群体内	35	363.000	10.371 43	68.70
总计	39	555.700	15.096 88	100

表 5 群体间的遗传分化值

Tab. 5 The genetic differentiation values among stocks

群体	QD	BH	CL	JN	LYG
QD	—	2.252 3	0.870 1	2.873 6	1.580 3
BH	0.181 7	—	0.950 1	1.880 4	2.064 4
CL	0.364 9	0.344 8	—	1.038 2	1.118 3
JN	0.148 2	0.210 1	0.325 0	—	2.334 6
LYG	0.240 3	0.195 0	0.309 0	0.176 4	—

注: 上三角为 N_m 值, 下三角为 G_{st} 值

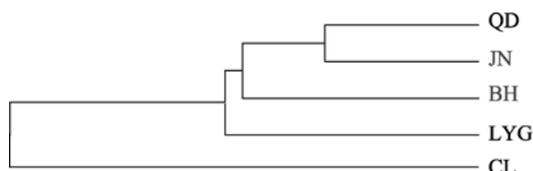


图 2 基于 RAPD 的西施舌 5 个地理群体的 UPGMA 分子系统树

Fig. 2 The UPGMA phylogenetic tree of five stocks of *Coelomastra antiquata* based on RAPD marker

3 讨论

本研究显示西施舌 5 个自然群体多态位点比例(62.07%~78.26%)和香农信息指数(0.210 5~0.312 3)都比较高, 说明西施舌遗传多样性较高。5 个自然群体间遗传距离为 0.068 3~0.223 9。其中长乐群体与其余 4 个群体间的遗传距离为 0.182 7~0.223 9, 4 个非长乐群体的遗传距离为 0.068 3~0.136 7。AMOVA 分析结果显示遗传分化大部分(68.7%)来自于群体内。其余的遗传分化来自于种群间。长乐群体和非长乐群体(QD, BH, JN, LYG)的遗传分化值(G_{st} =0.309 0~0.364 9)较高, 而非长乐群体间的 G_{st} 较低(0.148 2~0.240 3), 说明长乐群体有明显的遗传分化。本研究发现广西群体与北方群体亲缘关系近, 与福建群体亲缘关系远, 这与一般规律不符。

尤仲杰等^[9]用 RAPD 标记对我国山东胶南(JN),

江苏南通(NT, 即启东), 浙江台州(TZ), 福建福州(FZ, 即长乐), 广西北海(BH)5个自然群体西施舌的遗传差异进行了形态学和 RAPD 分析, NJ 法聚类分析显示北海群体与福州群体聚为一支, 用 UPGMA 法聚类显示, 北海群体单独为一支。尤仲杰认为北海群体可能已经形成了地理群体。黎中宝^[10]用等位酶对启东、福建漳港、广西北海 3 个地理群体的西施舌生化遗传多样性进行了研究, 结果显示, 漳港群体与北海群体聚为一支, 启东群体为单独一支。林昕^[15]对启东、福建长乐和深沪湾三个地理群体的西施舌进行了 ITS1 分析, 发现江苏西施舌与福建西施舌遗传距离较大, 但未形成区别于其他地区西施舌的独特的种。孔令锋等^[6-8]用形态学数据、AFLP 和 16S 分子标记对北方的 4 个地理群体(即墨、胶南、日照和启东)与福建的 2 个群体(长乐、漳港)的遗传差异进行了研究, 认为福建的西施舌与北方的 4 个群体存在明显的遗传差异, 聚类时明显的分为两支, 北方的 4 个群体聚为一支, 福建的 2 个群体聚为一支。本研究聚类分析发现西施舌 CL 群体聚为一支, 这与孔令锋的结果一致, 与黎中宝、林昕的结果不完全一致, 但本研究显示西施舌群体间遗传关系与其所处的地理位置远近不完全相符。广西群体(北海)与北方的 3 个群体(QD, JN, LYG)聚在一起, 这与尤仲杰的结果相反。广西群体与福建群体地理位置近, 易发生基因交流, 因此应该与福建群体遗传关系近, 或形成特殊的地理群体, 但本研究的结果显示它与北方群体亲缘关系近, 与福建 CL 群体亲缘关系远。

到目前为止, 我国学者从形态学, 生物化学(同工酶)和分子生物学(RAPD, AFLP, ITS1, 16S rRNA 基因)等多个方面对西施舌群体遗传多样性及遗传差异进行了研究, 大多数结果认为福建群体(包括长乐、神户湾、漳州等群体)遗传结构独特, 但广西群体的分类地存在分歧。因此, 广西群体的系统发生地位仍不明朗, 需用其他分子标记作深入的研究。我国西施舌分布于大连、江苏、浙江、福建、广东、广西等沿海地区。但福建长乐的西施舌个体大, 品质好, 也有其独特的分子标记。本研究的 RAPD 引物中, S299 引物扩增出的约 600bp 条带为长乐群体所特有, 且稳定清晰, 可作为鉴定长乐群体的分子标记。其他群体无典型的共享 RAPD 条带。

参考文献:

[1] 孟学平, 高如承, 董志国, 等. 西施舌营养成分分析

与评价[J]. 海洋科学, 2007, 31(1): 17-22.

- [2] 吴进锋, 陈利雄, 陈素文. 西施舌增养殖的研究现状与展望[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(2): 137-141.
- [3] 孟学平, 程汉良, 董志国. 我国西施舌研究现状及展望[J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 19(4): 71-75.
- [4] 陈文龙, 刘德经, 许万竹. 西施舌(*Maetra antiquata* Spengler)人工育苗初步研究[J]. 水产学报, 1966, 3(2): 130-141.
- [5] Liu H, Zhu J X, Sun H L, et al. The clam, Xishi tongue *Coelomaetra antiquata* (Spengler), A promising new candidate for aquaculture in China[J]. Aquaculture, 2006, 255(1-4): 402-409.
- [6] Kong L F, Li Q, Qiu Z X. Genetic and morphological differentiation in the clam *Coelomaetra antiquata* (Bivalvia: Veneroida) along the coast of China[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 343(1): 110-117.
- [7] Kong L F, Li Q. Genetic comparison of cultured and wild stocks of the clam *Coelomaetra antiquata* (Spengler) in China using AFLP markers[J]. Aquaculture, 2007, 271(1-4): 152-161.
- [8] Kong L F, Li Q. Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomaetra antiquata*[J]. Marine Biology, 2009, 15(7): 1 507-1 515.
- [9] 尤仲杰, 包永波, 张爱菊. 中国沿海西施舌 5 个自然群体形态差异和 RAPD 分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(3): 98-104.
- [10] 黎中宝, 王展林, 张桂玲, 等. 西施舌(*Coelomaetra antiquata*)群体遗传多样性与分化的研究[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(30): 302-306.
- [11] 高悦勉, 孙洋, 才慧梅. 3 种扇贝遗传结构的 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 25-31.
- [12] 刘萍, 何玉英, 孙昭宁, 等. 中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(2): 1-6.
- [13] 杨奔, 尤锋, 李军, 等. RAPD 对圆斑星鲽和条斑星鲽养殖群体的遗传多样性研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(8): 26-29.
- [14] Yeh F C, Yang R, Boyle T J, et al. PopGene32, Microsoft Windows-based Freeware for Stock Genetic Analysis. version 1.32[R]. Edmonton, Alberta, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 2000.
- [15] 林昕, 梁君荣, 高亚辉, 等. 3 个地区西施舌的 ITS-1 基因片段序列分析[J]. 生命科学研究, 2008, 12(1): 14-19.

(下转第 43 页)