

## 一个皱纹盘鲍人工群体内个体大小遗传变异的 RAPD 分析\*

孙 博<sup>1,2</sup> 刘 晓<sup>1</sup> 张国范<sup>1\*\*</sup> 赵洪恩<sup>3</sup> 郭希明<sup>4</sup>

(1 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(2 中国科学院研究生院 北京 100035)

(3 大连市水产研究所 大连 116011)

(4 Haskin Shellfish Research Lab Rutgers University Port Norris NJ 08349 USA)

**摘要** 从以日本野生皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)为亲本进行群体繁殖所得人工群体的子1代中分别选择大(BI)、中(ME)、小(SM)等3个子群体各20个个体,进行RAPD分析。用11条随机引物及7个双引物组合共扩增出153条DNA片段,其中总群体多态性片段数为110条,多态性片段的比例为72.37%。根据扩增片段的共享度用TFPGA软件进行计算,结果表明:(1)SM与ME的遗传距离较近,而与BI的遗传距离相差较大;(2)子群体间遗传分化系数为7.64%,表明各个子群体间在遗传上存在一定的差异,对于群体进行选择将有一定的意义;(3)各子群体表现出了丰富的遗传变异,子群体BI、ME、SM的遗传多样性分别为0.2063、0.2358和0.2363,表明BI子群体具有相对较高的纯合度,在选择育种中有较高价值。

**关键词** RAPD, 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino), 遗传距离, 遗传分化系数

**中图分类号** Q17.S9 **文献标识码** A **文章编码** 1000-3096(2003)05-0027-04

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)是我国海珍品养殖的重要种类<sup>[1~2]</sup>,由于其经济价值高且自然资源远远满足不了人们日益增长的需求,近10年来,人工养殖发展迅速。但目前在大力发展养殖业的同时,对其养殖群体的遗传分化缺乏深入研究。本文报告人工养殖皱纹盘鲍群体遗传分化的RAPD研究结果,以期对皱纹盘鲍的选择育种工作提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用皱纹盘鲍样本于2001年12月采自大连市水产研究所,系1998年春以日本野生皱纹盘鲍为亲本进行群体繁殖所得人工群体的子1代。从该人工群体中按照不同的壳长范围选择3个子群体:大个体子群体(BI)、中等个体子群体(ME)、小个体子群体(SM),从各子群体中分别取雌雄各10个个体。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组DNA提取

大中小个体各20枚,每个个体取足部肌肉100 mg,切碎后置于研钵中,加入1 000  $\mu$ L的提取缓冲

液,研磨均匀后取600  $\mu$ L置于1.5 mL离心管中,加入浓度为10 mg/mL的RNA酶5.0  $\mu$ L,混匀后加入50  $\mu$ L 10% SDS与浓度为10 mg/mL的蛋白酶K 10  $\mu$ L,55  $^{\circ}$ C消化4 h后用等体积的平衡酚抽提两次,再用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),以及氯仿:异戊醇(24:1)各抽提1次,1倍体积的异丙醇沉淀DNA后用70%乙醇洗涤沉淀,自然干燥后,加100  $\mu$ L TE溶解并于4  $^{\circ}$ C保存。

#### 1.2.2 随机引物

实验所用的11条随机引物购自上海生物工程公司。随机引物及其碱基序列如表1所示。

7个双引物<sup>[3]</sup>组合分别为S164-S465, S164-S221,

\* 国家863计划项目2001AA6201070号和国家杰出青年基金39825121号资助。

第一作者:孙博,出生于1978年,硕士研究生,研究方向为实验海洋生物技术。Email:sunbo@ms.qdio.ac.cn

\*\* 通讯作者:gfzhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2002-10-08,修回日期:2003-02-20

S176-S405, S176-S473, S472-S405, S472-S476, S164-S469。

表1 随机引物及其碱基序列

Tab.1 The sequences of RAPD primers

| 引物   | 序列(5'→3')  | 引物   | 序列(5'→3')  |
|------|------------|------|------------|
| S476 | CCAAGCTGCC | S473 | GGAGTGCCTC |
| S472 | AAGGGCGAGT | S469 | GTGGTCCGCA |
| S468 | ACATCGCCCA | S465 | CCCCGGTAAC |
| S405 | GGGAACGTGT | S221 | TGACGCATGG |
| S176 | TCTCCGCCCT | S164 | CCGCCTAGTC |
| S161 | ACCTGGACAC |      |            |

### 1.2.3 PCR 反应

基因组 DNA 在 Biometra Amp 型 PCR 扩增仪上经过 94 ℃ 预变性 1 min 后, 进行 40 个扩增循环, 每个循环包括 94 ℃ 1 min, 36 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 最后在 72 ℃ 补平 10 min。扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 紫外灯光下观察, 拍照。

### 1.2.4 数据分析

1.2.4.1 数据统计 将扩增带按照 0, 1, 2 进行统计, 即出现对应的扩增带时纪录为 1, 没有此带时纪录为 2, 此带模糊或缺失纪录为 0, 然后输入 TFGA 软件进行分析。

1.2.4.2 群体间遗传距离 任意两个个体间遗传相似性和遗传距离根据 Nei 等 1978 年的公式计算:

$$F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y), D = 1 - F$$

$F$  为两个个体间遗传相似度,  $D$  为两个个体间遗传距离。 $N_{XY}$  为  $X$  和  $Y$  两个个体共有的扩增带,  $N_X, N_Y$  为

$X$  和  $Y$  个体分别拥有的扩增带。

1.2.4.3 多态位点百分率  $P^{[4]}$  多态位点百分率  $P$  是反映居群内变异水平的重要指标之一, 其计算公式是:  $P = (k/n) \times 100\%$ 。其中,  $k$  为多态位点数目;  $n$  为所测定位点的总数。

1.2.4.4 遗传多样性  $h$  的估算<sup>[4]</sup> RAPD 扩增产物为显性标记, 只能检测一对等位基因的有无。根据 Hardy-weinberg 平衡定律, 将无带视为隐性纯合子, 可以求得位点隐性基因的频率  $q$ , 进而求得该位点显性基因频率  $p = 1 - q$ , 则显性纯合体的频率为  $p^2$ 。

一个基因位点的基因多样性  $h = 1 - \sum x_i^2$ , 其中  $i$  为该位点等位基因数,  $x_i$  为该位点第  $i$  等位基因。可求出一个 RAPD 位点的多样性为  $h = 1 - q^2 - p^2 = 2pq$ , 这样  $n$  个多态位点平均多样性即群体内多样性:  $H = (1/n) \sum 2pq_i$ 。

1.2.4.5 群体间遗传分化系数  $G_{ST}^{[4]}$   $G_{ST}$  即为群体间的遗传多样性占群体多样性的比例。 $G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ , 其中,  $H_T$  是群体总遗传多样性,  $H_T = 1 - J_T$ ,  $J_T$  为群体总遗传一致性,  $J_T = 1 - 1/n \sum \sum x_i^2$ ,  $x_i$  是一个位点第  $i$  个等位基因在总群体中的平均频率,  $n$  为位点总数。 $H_S$  为平均群体内多样性,  $H_S = \sum H/S$ , 即为  $S$  个群体多样性的平均值。

## 2 结果

### 2.1 3 个子群体个体的生物学参数

不同子群体样本的生物学参数见表 2, 从表中数据可见 3 个子群体的个体大小差异显著。

表2 3 个子群体个体的生物学参数

Tab.2 The biological parameters of the three size-classes

| 子群体 | 生理参数        |             |              |              |
|-----|-------------|-------------|--------------|--------------|
|     | 壳长(cm)      | 壳宽(cm)      | 全湿质量(g)      | 软体部质量(g)     |
| SM  | 4.20 ± 0.13 | 2.91 ± 0.11 | 8.45 ± 1.21  | 6.18 ± 1.12  |
| ME  | 6.54 ± 0.17 | 4.34 ± 0.12 | 35.96 ± 3.32 | 28.48 ± 3.06 |
| BI  | 8.14 ± 0.17 | 5.38 ± 0.12 | 66.47 ± 5.78 | 53.29 ± 4.67 |

### 2.2 不同子群体的多态位点百分率

皱纹盘鲍的 3 个子群体共 60 个个体间的 RAPD 扩增带型差异明显, 在各子群体内每个引物扩增带平均 5~6 条表现出多态性, 3 个子群体的多态位点百分率有较明显的差异 (见表 3), 其中小个体子群体 (SM) 最大, 为 67.97%, 中等个体子群体 (ME) 为

66.67%, 大个体子群体 (BI) 最小, 为 62.75%。这一结果说明: 各子群体均保持较高的遗传多样性, 其中多态位点百分率最高的子群体 (SM) 与最低的子群体 (BI) 间相差 5.22 个百分点, 表明在该皱纹盘鲍群体中, 各子群体遗传多样性已经出现了一定的分化。

表 3 3 个子群体多态位点百分率的比较

Tab.3 Comparison of the polymorphic loci of the three size-classes

| 子群体 | 位点数 | 多态位点数 | 多态位点百分率(%) |
|-----|-----|-------|------------|
| SM  | 153 | 104   | 67.97      |
| ME  | 153 | 102   | 66.67      |
| BI  | 153 | 96    | 62.75      |

### 2.3 子群体内遗传多样性

根据 TFGA 软件求得各子群体的群体内遗传多样性最大的是 SM, 为 0.236 3; 其次是 ME, 为 0.235 8; 最小的是 BI, 为 0.206 3, 可见, 大个体子群体 (BI) 表现出了相对较高的纯合度。该结果表明, 利用 BI 子群体为亲本进行进一步的选择育种工作, 对于皱纹盘鲍选择群体的纯化可能较为有利。

### 2.4 子群体间遗传分化系数

将 3 个子群体视为一个总群体, 可求得群体总遗传多样性  $H_T$  为 0.244 8, SM、ME、BI 三个子群体平均群体内遗传多样性  $H_S$  为 0.226 1, 从而可得 3 个子群体间的遗传分化系数  $G_{ST}$  :

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T = (0.244 8 - 0.226 1) / 0.244 8 = 0.076 4 = 7.64\%$$

该结果表明: 不同子群体间在遗传上存在一定的

表 4 3 个子群体间随机扩增多态 DNA 片段共享度 ( $F$ )

Tab.4 Genetic similarity among the three size-classes

| 子群体 | SM      | ME      |
|-----|---------|---------|
| SM  |         |         |
| ME  | 0.969 9 |         |
| BI  | 0.941 1 | 0.956 4 |

表 5 3 个子群体间的遗传距离指数 ( $D$ )

Tab.5 Nei's genetic distance among the three size-classes

| 子群体 | SM      | ME      |
|-----|---------|---------|
| SM  |         |         |
| ME  | 0.030 5 |         |
| BI  | 0.060 7 | 0.044 5 |

差异, 但群体内的遗传变异水平仍然较高。

### 2.5 子群体间遗传距离

由表 4 与表 5 可见, SM 与 BI 遗传距离较大, 相似

性较小, 而 SM 与 ME, ME 与 BI 间的遗传距离均不如 SM 与 BI 之间, 可见 3 个子群体间已表现出了与表型差异趋势一致的一定的遗传距离, 为下一步的选择育种工作提供了依据。

## 3 讨论

### 3.1 实验用皱纹盘鲍人工养殖群体的遗传多样性

用 RAPD 分子标记对所研究的皱纹盘鲍人工养殖群体进行遗传多样性的初步评估, 共检测出 RAPD 位点 153 个, 多态位点 110 个, 多态位点的比例为 72.37%。说明 RAPD 技术用于研究皱纹盘鲍核 DNA 的遗传多样性具有较高的检出率和灵敏度, 并证明本文所研究的皱纹盘鲍人工养殖群体中存在着较丰富的遗传多样性, 这些遗传变异构成了皱纹盘鲍优良种质选育的物质基础。此外, 部分多态性片段在皱纹盘鲍不同子群体中出现的频率不同, 高频率的多态性位点可能与子群体的某些特异性状相连锁, 因此可对皱纹盘鲍分子标记辅助育种工作提供一定的参考价值。

### 3.2 子群体的遗传分化对于选择育种的意义

遗传分化系数  $G_{ST}$  是测定群体遗传分化的主要参数<sup>[5]</sup>。本实验分析得出的  $G_{ST} = 0.076 4$ , 表明各个子群体间在遗传上存在一定的差异, 但群体内的遗传变异水平仍然较高。标准遗传距离 ( $D$ ) 是估计群体间遗传变异分布情况的另一重要指标, 根据 Nei 1976 年估算, 同一物种的地区种群间  $D$  值变动在 0~0.05 之间<sup>[6]</sup>。本实验按照 Nei 1978 年的算法所得  $D$  值 (表 5) 与该值接近, 表明子群体间出现的遗传分化程度已与同一物种的种群间分化程度相当, 说明本研究用皱纹盘鲍不同子群体在选择育种中已具备一定的价值。另外, 在本实验中所得的 BI 子群体内遗传多样性最小, 而 SM 子群体内遗传多样性最大, 表明 3 个子群体产生的分化趋势是有利于选择方向的。利用 BI 子群体为亲本进行进一步的选择育种工作, 对于皱纹盘鲍选择群体的纯化可能较为有利。作者对皱纹盘鲍不同家系 F1 的 RAPD 分析表明<sup>[7]</sup>, 以来自日本野生皱纹盘鲍为亲本建立的 JJ 家系的 F1 群体遗传多样性为 0.164 9, 显著低于本研究子群体 BI 的遗传多样性 0.206 3, 表明群体选择的纯化速率仍显著低于家系选择。以群体选择和家系选择相结合, 在适当的选择强度下, 可得到更加纯化的、符合预期性状的子代个体,

最终能够形成有价值的品系。

#### 参考文献

- 1 赵洪恩. 鲍的增养殖. 沈阳: 沈阳出版社, 1999
- 2 高绪生, 王琦, 王仁波, 等. 鲍鱼. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2000
- 3 Hu J, Eysden J V, Quiros C F. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions. *PCR Methods and Application*, 1995, 4: 346-351
- 4 易能军. 林木群体多样性和多位点遗传结构. 生物多样性, 1996, 4(3): 153-159
- 5 宋书娟, 李雅轩, 郭平仲. 小麦异交群体长期选择早代的 RAPD 多态性分析. 首都师范大学学报(自然科学版), 1999, 20(3): 53-61
- 6 武仙山, 李雅轩, 宋书娟, 等. 小麦异交群体选择分化的 RAPD 分析. 遗传, 2001, 23(1): 33-37
- 7 张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F1 的 RAPD 标记. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 484-491

## RAPD ANALYSIS OF THREE SIZE CLASSES OF ABALONE FROM A CULTURED POPULATION

SUN Bo<sup>1,2</sup> LIU Xiao<sup>1</sup> ZHANG Guo-Fan<sup>1</sup> ZHAO Hong-En<sup>3</sup> GUO Xi-Ming<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(<sup>2</sup>The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100035)

(<sup>3</sup>Dalian Institute of Fisheries, Dalian, 116011)

(<sup>4</sup>Haskin Shellfish Research Lab, Rutgers University, Port Norris, NJ 08349 USA)

Received: Oct., 8, 2002

**Key Words:** RAPD, *Haliotis discus hannai* Ino, Genetic variation, Genetic distance,  $G_{ST}$

### Abstract

Three size classes (big, medium and small) of abalone *Haliotis discus hannai* Ino were sampled from a cultured population at the Dalian Institute of Fisheries in December 2001. The abalones sampled were 3 years old, and 20 abalones were selected from each size class for genetic analysis using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Eleven primers and seven primer pairs were selected, and 153 loci were analyzed. For the whole population, the number of polymorphic loci was 110 and the percentage of polymorphic loci was 72.37%. Analysis with the TFPGA program showed: (1) the genetic distance between the small and big size-classes was the largest, while the distance between the small and middle size-classes was the smallest; (2) the relative genetic differentiation ( $G_{ST}$ ) was 7.64%, suggesting that these genetic differences among the three size-classes and selective breeding would be useful; (3) there were abundant genetic variations with in each size-class, and the heterozygosity of the small size-class was 0.2363, the medium class was 0.2358 and the big was 0.2063. Because of its relatively lower heterozygosity, the big size-class may respond well to selection on large body size.

(本文编辑:张培新)