

宁波长街缢蛏遗传结构的 RAPD 分析

李成华^{1,2,3}, 李太武¹, 苏秀榕¹, 宋林生¹

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放研究室, 山东 青岛 266071; 2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用 RAPD 技术对宁波长街自然群体和养殖群体缢蛏 [*Sinonovacula constricta* (Lamarck)] 的遗传背景进行了比较研究。21 个引物共扩增出 121 条清晰可辨的 RAPD 标记, 大小在 250~2 500 bp 之间, 分别统计上述位点, 得到两群体各遗传参数。结果表明, 养殖环境对其影响较小, 两者间遗传距离仅为 0.049 7, 近交系数 (F_{is}) 为 0.073 5, 有效繁殖个体数 (N_{em}) 为 3 151 4; 两者平均遗传杂合度比较却发现养殖群体略大于野生群体, 与其他的水产动物研究结果不同。作者推测上述结果与养殖缢蛏苗种来自天然采苗、无累代养殖和养殖区饵料较自然海区丰富等因素有关。

关键词: 缢蛏 [*Sinonovacula constricta* (Lamarck)]; RAPD; 遗传结构; 自然和养殖群体

中图分类号: S968.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)10-0048-04

缢蛏 [*Sinonovacula constricta* (Lamarck)] 俗称蛏子、青子等, 广泛分布于中国南北沿海滩涂, 是浙江、福建主要海水滩涂养殖的经济贝类, 具有悠久的养殖历史。由于它独有的食用价值, 其养殖面积 10 年来扩大约 10 倍, 仅浙江省的温州、象山两地就达到 20 000 ha, 年产值约达 10 亿, 经济效益巨大^[1]。宁波长街一带缢蛏养殖历史悠久, 再加上濒临三门湾, 常年有大量淡水注入, 海水咸淡适宜, 饵料丰富, 涂质以泥沙为主, 因而蛏子生长快、个体大、肉嫩而肥、色白味鲜, 被誉为蛏中的佳品。由于 RAPD 标记技术问世以来以其灵敏、方便、多态性高等优点, 在群体遗传学研究中, 尤其是检测群体内和群体间的遗传多样性和识别群体间遗传标记等领域应用广泛^[2]。为了研究出长街缢蛏的遗传结构特点, 作者利用 RAPD 技术对长街养殖和自然缢蛏种质资源进行了初步调查, 以便为该物种种质的复壮、提纯提供原始基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用缢蛏样品均由宁波长街镇宁海大河水产品有限公司提供, 每个群体取 40 个左右, 活体带

回实验室, -70℃超低温冰箱保存、备用。

1.2 基因组 DNA 的提取、检测及定量

1.2.1 提取方法

参照文献[3], 稍加修改。提取前用游标卡尺测定两群体中每个个体的壳长和壳宽。

1.2.2 检测方法

取 2 μL DNA 母液, 在 0.8% 琼脂糖上电泳检测。电泳完毕后, 用上海复日成像系统拍照, 分析 DNA 质量。

1.2.3 定量

取适量稀释样品于美国瓦里安 Cary100 紫外可见分光光度计下测定 260 nm 波长下的光吸收值, 计算 DNA 母液浓度, 调整终浓度至 10 mg/L, 4℃保存、备用。

1.3 随机引物

试验所用的 20 个随机引物是从 100 条引物中筛

收稿日期: 2003-07-10; 修回日期: 2003-11-10

基金项目: 宁波市科技局重点资助项目(00N0100-01)

作者简介: 李成华(1978-), 男, 山东济宁人, 硕士, 研究方向为虾贝遗传与病害防治研究, E-mail: lichenghua1220@hotmail.com

选获得的, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 PCR 反应

RAPD 反应条件参考文献[3], 并稍加优化。基因组 DNA 在 PE9600 PCR 扩增仪上进行。25 μ L 反应体系中含有 2.5 μ L 10 $\times$ buffer, 0.2 μ mol/L dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl₂, 25 ng DNA, 66 ng Primer 及 1U Taqase。阳性对照以等体积的 ddH₂O 替代基因组 DNA, 其他组成与上述反应体系相同。经过 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 进行 40 个循环。每一个循环包括 94 $^{\circ}$ C 1 min, 37 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 拍照, 保存, 用于以后的群体分析。

1.5 数据处理

将 RAPD 标记作为等位基因进行研究, 通常有 4 种假设^[4]: (1) RAPD 产物为显性等位基因, 符合孟德尔遗传; (2) RAPD 座位上的等位基因频率符合 Hardy-Winberg 平衡; (3) 纯合隐性个体的等位基因是完全一致的(即它们来自相同的突变); (4) 显性等位基因, 即扩增出的 RAPD 产物也是完全一致的。

多态位点比例 $P = \text{多态扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$

群体的平均杂合度^[5,6]: $H = \sum (1 - p_i^2) / n$, 其中 p_i 是第 i 个等位基因的频率; n 为所检测到的位点数。

群体间的近交系数^[7] (F_{st}): $F_{st} = \sigma^2 q / pq$, 其中 p 和 q 为平均基因频率, $\sigma^2 q$ 为基因频率方差, $\sigma^2 q = \sum (q_i - q)^2 / n$ 。以纯合隐性个体(即对应某一扩增条带, 不出现该扩增带的个体)频率的平方根来计算隐性等位基因 a 的基因频率 q , 显性等位基因 A 的基因频率 $p = 1 - q$, q_i 是第 i 个隐性等位基因的频率。 $N_{em} =$

$[(1/F_{st}) - 1] / 4$, N_{em} 为有效繁殖个体数^[7]。两群体间的遗传距离 D , 根据下列计算方法计算:

$$S_{XY} = 2n_{XY} / (n_X + n_Y)$$

式中, S_{XY} 为个体 X 和 Y 间的遗传相似度(通常称 RAPD 片段共享度), n_{XY} 为个体 X 和 Y 的共享片段数; n_X 和 n_Y 分别为个体 X 和 Y 的随机扩增片段数, 并据此分别计算在群体 i 和 j 内两两个体间的平均相似度 S_i 和 S_j 以及群体内任意一对个体的平均相似度 S_{ij} , 两群体间的遗传相似度 F_{ij} 则为:

$$F_{ij} = 1 + S_{ij} - (S_i + S_j) / 2$$

两群体的遗传距离为: $D = 1 - F_{ij}$ 。

2 结果

2.1 群体间形态性状测定结果

根据两群体壳长和壳宽的测定结果, 利用 Microsoft Excel 比较分析两者间的差异程度。结果表明养殖群体无论是在壳长(5.678 cm $\pm$ 0.140 cm)还是在壳宽(1.882 cm $\pm$ 0.022 cm)上都大于相同壳龄的自然群体的相应测定结果(4.388 cm $\pm$ 0.125 cm, 1.420 cm $\pm$ 0.022 cm), 且差异显著($P < 0.01$)。

2.2 部分扩增电泳图谱

自然群体和养殖群体的 20 个个体, 在 20 个引物中均扩增出清晰、可分辨的 DNA 条带, 片段大小在 250~2500 bp 之间, 符合 RAPD 分析的要求, 可以用于以后的群体间比较分析。同时, 阴性对照组(以等体积 ddH₂O 替代模板 DNA) 无任何扩增, 这样就消除了可能的“噪音”污染, 进一步证实了扩增图谱的差异是由于个体间或群体间的 DNA 组成的差异造成的。扩增图谱见图 1。

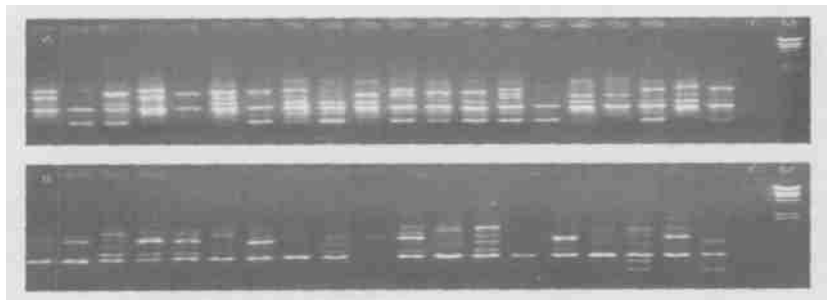


图 1 自然群体(B)与养殖群体缢蛏(A)随机引物 S198 的扩增电泳图谱

Fig. 1 RAPD profiles generated with arbitrary primers S198 in cultural (A) and natural (B) stocks of *Sinonovacula constricta*

M: λ -Hind III 酶切 Marker; C: 阴性对照

M: λ -Hind III digest DNA Marker; C: negative control

2.3 RAPD 标记统计结果

以出现扩增条带的记为 1, 相应位点无扩增条带的记为 0, 计算各位点在各群体的基因频率; 借助 M-

croexcel 分别计算出两群体的平均遗传杂合度和群体间近交系数和有效繁殖个体数; 同时利用 PHILIP 3.5 的 Gendist 软件, 得到两群体间的遗传距离(表 1)。

表 1 自然群体和野生群体 RAPD 标记分析结果

Tab.1 Analysis of RAPD markers in cultural and natural stocks of *Sinonovacula constricta*

群体	位点数	多态位点比例(%)	平均遗传杂合度	遗传距离	近交系数	有效繁殖亲本数
自然群体	118	75.42	0.196 5	0.049 7	0.073 5	3.151 4
养殖群体	114	74.56	0.209 6			

3 讨论

3.1 自然群体和养殖群体遗传变异的比较分析

群体的遗传变异水平是评估生物资源状况的一个重要标准, 它与生物的抗病力、生长速度和个体大小等生产性状紧密相关^[9,10]。因此, 检测群体的遗传变异水平, 尤其是比较自然群体与养殖群体各遗传参数的差异情况, 对了解人为因素对贝类基因库的影响程度以及其当前种质资源现状和与之相关的种质复壮工作意义重大。

Thorp 提出群体间的遗传距离是 0.030~ 0.200; Wright 则认为两群体间的 N_m 小于 1, 表示群体间发生显著分化, N_m 在 1~ 5 之间, 表示群体间发生重要分化, 50 以上群体分化不明显; F_{st} 在 0~ 0.05 之间的群体无遗传分化的标准的结论。结合作者的研究结果, 长街养殖缢蛭遗传多样性与自然群体相比遗传多样性没有显著地降低, 平均遗传杂合度甚至稍高于自然群体。两群体间的近交系数、遗传距离和有效繁殖亲本数等统计结果也证实了两者间具有不明显的遗传分化。造成上述结果的主要原因作者认为主要与缢蛭苗种的人工采苗(即野生群体与养殖群体为同一苗种)和无累代养殖以及自然海区饵料相对贫乏有关。进一步的实验证据来自作者对缢蛭数量性状的测定结果上。本次实验材料两者壳龄相同, 但在壳长和壳宽上养殖群体与自然群体差异极显著($P < 0.01$)。与此同时, 作者实验室对浙江象山养殖、临海、福建福鼎、辽宁庄河四地理居群缢蛭遗传结构进行了研究(结果另文发表)。与上述研究结果相比, 宁波长街缢蛭在多态位点比例上明显高于上述四地理群体, 进一步证实了长街缢蛭重要的经济地位。因此保持和合理利用长街缢蛭的种质资源成为缢蛭养殖业需要进一步解决的重大课题。

3.2 缢蛭养殖前景分析

丰富的遗传多样性是物种具有较高的生存潜能、进化潜能以及丰富的遗传育种和种质改良潜能的内在表现, 是缢蛭养殖业具有广阔的发展前景的重要表现^[11]。目前, 对多种水产经济动物的遗传多样性状况已经取得了一些成果(表 2), 与之相比, 缢蛭种质资源状况良好, 在维持现有的遗传多样性水平的前提下, 缢蛭的人工养殖业必定有广阔的发展空间。但人们也必须清楚地意识到随着缢蛭育苗技术的不断突破, 在以后的人工繁殖过程中, 必须科学合理地处理各个技术环节, 保持足够大的亲本容量, 避免亲本频繁的自交, 同时辅助于人工选育等举措, 一定可以保持缢蛭养殖业的持续、健康和快速发展。

表 2 不同经济水产动物 RAPD 统计结果比较

Tab.2 The comparative results from different aquatic animal

物种名	实验样本	引物数	多态位点比例(%)	平均遗传杂合度
自然群体泥蚶	20	20	84.00	0.268 3
养殖群体泥蚶	20	20	73.43	0.251 3
野生栉孔扇贝	20	20	75.82	0.27
养殖栉孔扇贝	20	20	73.47	0.26
野生日本对虾	20	20	54.14	0.215 7
养殖日本对虾	20	20	37.91	0.134 3

参考文献:

[1] 尤仲杰, 徐善良, 谢起浪花. 浙江沿岸贝类资源及其增殖[J]. 东海海洋, 2000, 18(1): 50- 56
[2] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生群体与养殖群体遗传结构的 RAPD 研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 261- 266
[3] 李太武, 李成华, 宋林生, 等. 五泥蚶群体遗传结构及遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 2003, 11(2):

- 118– 124.
- [4] Apostol B L, Black W C, Reiter P. Population genetics with RAPD- PCR markers: the breeding structure of *Aedes argypti* in Puerto Rico[J]. **Heredity**, 1996, **76**(4): 325– 334.
- [5] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance[J]. **Genetics**, 1974, **76**(2): 379– 390.
- [6] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of human races[J]. **Journal of Human Genetics**, 1978, **23**(4): 341– 369.
- [7] 宋林生,李俊强,李红蕾. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与养殖群体的遗传结构及遗传分化的研究[J]. 高技术通讯, 2002, **12**(7): 83– 86.
- [8] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases[J]. **Process Natural Academic Science**, 1979, **76**(10): 5269– 5273.
- [9] Chevassus B, Dorson M. Genetics of resistance to disease in fishes[J]. **Aquaculture**, 1990, **85**: 83– 107.
- [10] Ferguson M M, Drahushchak L R. Disease resistance and enzyme heterozygosity in rainbow trout[J]. **Heredity**, 1990, **64**: 413– 417.
- [11] 权洁霞,戴继勋,沈颂东,等. 梭鱼人工群体与自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD) 分析[J]. 海洋学报, 2000, **22**(5): 82– 87.

Genetic structure analysis of the natural and the cultural stocks of *Sinonovacula constricta* in Changjie, Ningbo

LI Cheng- hua^{1,2,3}, LI Tai- wu¹, SU Xiu- rong¹, SONG Lin- sheng²

(1. Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 3. Graduate Student Faculty, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Key word: *Sinonovacula constricta*, RAPD, genetic structure, natural and cultivated stock

Received: Jul, 10, 2003

Abstract: RAPD technique was explored to evaluate the genetic structure between natural and cultivated stock of *Sinonovacula constricta* distributed in Changjie of Ningbo. 121 distinguished RAPD sites, ranging from 250 bp to 2 500 bp in size, were acquired with 21 decamer random primers. The statistic results, including genetic distance, inbreeding coefficient and available number for reproduction, informed us that the stock condition exerted little influence on their genetic structure. The values of the above genetic parameters were 0.049 7, 0.073 5 and 3.151 4 in turn. The heterozygosities was higher in cultivated stock than natural one, which was not consistent with any other reports in other aquatic animals. This may be due to the abundance bait and natural larva collection.

(本文编辑: 张培新)