

我国沿海不同地理原种文蛤(*Meretrix meretrix*) 的 SRAP 分析*

张志伟¹ 陈爱华¹ 姚国兴¹ 吴建平¹ 吴杨平¹ 许广平¹ 程汉良²

(1. 江苏省海洋水产研究所 南通 226007; 2. 淮海工学院海洋学院 连云港 222005)

摘要 采用序列相关扩增多态 SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)标记对国家级江苏文蛤良种场(筹)保存的广西北海(GX)、江苏南通(JS)、辽宁大连(LN)三个地理种群原种文蛤进行种质资源分析。结果表明: (1) 15 对引物在文蛤 3 种群共扩增 223 个位点, 其中多态位点数为 159 个, 多态性位点百分率为 71.30%, 显示了较高的多态性; (2) GX、JS、LN 3 种群的多态性位点百分率分别为 69.12%、57.81%、51.85%, 平均杂合度分别为 0.2532、0.2162、0.1836, 香农信息指数分别为 0.3649、0.3127、0.2714, 均以 GX 种群最高, 表明 GX 种群遗传多样性更为丰富; (3) 3 种群扩增位点显性基因频率的分布规律揭示, 与 LN 和 JS 两种群相比, GX 种群中低频基因位点显著增加, 而隐性纯合基因位点显著减少, 表明 GX 种群中存在大量稀有等位基因。各地理种群原种文蛤遗传多样性水平相对较高, 遗传改良潜力大, GX 种群作为选择育种的基础群更为适合。

关键词 文蛤, 种质资源, SRAP

中图分类号 S968.3

文蛤 (*Meretrix meretrix*) 隶属于瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、帘蛤目 (Veneroidea)、帘蛤科 (Veneridae), 为广温广盐性贝类, 广泛分布于我国沿海(王晓梅等, 2009)。由于其肉味鲜美, 营养丰富, 素有“天下第一鲜”之称, 是一种经济价值较高的贝类, 此外还具有很高的药用价值。文蛤养殖规模的扩大引起对苗种需求的不断增加, 各地无序的引种对文蛤种质资源的保护和开发利用极为不利。因此, 开展文蛤种质资源的遗传多样性研究, 比较各地理种群种质资源差异, 对于保护文蛤资源、选育新品种非常有益。

目前, 国内对文蛤种质资源的研究采用的方法主要集中在 RAPD(沈怀舜等, 2003)、ISSR(陈大鹏等, 2004)、AFLP、fAFLP(林志华等, 2008, 2009)等上, 对基因组的扩增具有很大的随机性, 而测序技术中的 ITS(李太武等, 2006)、CO_I(程汉良等, 2007)片段则反映核糖体与线粒体基因组 DNA 的遗传变异情况。SRAP(Sequence-related amplified polymorphism) (Li

et al, 2001)是近年建立的一种分子标记, 该技术具有独特的引物设计原则, 上游引物可以特异性结合在基因的外显子或启动子区域, 下游引物可特异地与基因的内含子配对, 针对基因组的 ORF 进行扩增, 由于个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性扩增产物。该方法采用的引物较长, 退火温度较高, 从而增加了其稳定性, 具有简便、稳定、产率高、适用广泛和便于克隆目标片段的优点, 已广泛应用于多种作物比较基因组学(吴伟怀等, 2004)、遗传多样性分析(林忠旭等, 2004; Snowdon et al, 2004)、遗传图谱构建(林忠旭等, 2004; 潘俊松等, 2005)、重要性状的标记以及相关基因的克隆(潘俊松等, 2005; 刘雅辉等, 2008)等方面。该技术应用于水产生物草鱼(丁炜东等, 2008; 张志伟等, 2007)、坛紫菜(谢潮添等, 2008)种质资源分析上已有报道, 但应用于软体动物文蛤的有关研究国内外尚未见相关报道。

本实验在确定该技术对文蛤遗传多样性分析适

* 江苏省水产三项更新工程项目, K2007-7 号、BZ2008-9 号; 江苏省自然科学基金项目, BK2008191 号。张志伟, 博士, E-mail: zhzhwei2005@126.com

通讯作者: 姚国兴, 研究员, E-mail: yaogx4800@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-17, 收修改稿日期: 2009-06-25

用性的基础上,以我国沿海辽宁、江苏、广西的野生原种文蛤为材料,采用 SRAP 分子标记技术分析了我国沿海不同生态地理类群原种文蛤的种质资源状况,为科学保护和合理利用我国文蛤种质资源以及文蛤新品种的培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验用文蛤样品来自国家级江苏文蛤良种场(筹)保存的文蛤(*Meretrix meretrix*)原种,于 2005 年 3 月—2007 年 4 月分别采自广西北海(GX)、江苏南通(JS)、和辽宁大连(LN)自然海区。原种采集地、采样时间及数量等基本信息列于表 1。所取样品均活体运输到实验室,每个样品取闭壳肌,保存于 -86℃ 的超低温冰箱中,用于 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 提取

取约 0.1g 斧足肌肉用双蒸水冲洗,用滤纸吸干剪碎后放入 1.5ml 的离心管,分别加入 450μl STE 缓冲液(150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA), 12.5μl 的 10% SDS, 10μl 蛋白酶 K (20mg/ml) 混匀,55℃ 消化过夜,用苯酚、氯仿各抽提一次,等体积的异丙醇沉淀,12000r/min 离心 30min,沉淀用 70%的乙醇洗 2 次,再用 30μl 双蒸水溶解,在 0.8%的琼脂糖凝胶上检测 DNA 的质量和浓度。

1.3 SRAP 引物序列

SRAP 引物序列参考 Li 等(2001) (表 2),由上海申能博彩生物科技有限公司合成。

1.4 SRAP-PCR 扩增

PCR 反应所需 *Taq* 酶和 dNTP 均购自上海生工生物工程公司,PCR 反应采用 25μl 的反应体系,体系中含有 2.5μl 10×*Taq* DNA 聚合酶缓冲液, 2μl MgCl₂ (25mmol/L), 1μl dNTP (2.5mmol/L), 上下游引物各 0.5μl, 1.5U 的 *Taq* DNA 聚合酶,在 Eppendorf Mastercycler PCR 仪上进行扩增。扩增程序为 94℃ 变性 5min; 然后开始 5 个循环(94℃ 变性 45s, 35℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min); 再进行 35 个循环(94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min); 最后 72℃ 延伸 7min。

1.5 电泳分析

扩增产物先在 2%的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色,检测扩增产物的有无,然后用 6.5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色,拍照,记录数据。

1.6 数据处理

对显色后的图谱进行统计,每一条带视为一个位点,有带记为 1,无带记为 0,转换成数字矩阵再进行分析,选择基因频率作为比较指标,用 PopGene32 (Version 1.31)进行分析,SPSS13.0 做显著性检验。测量 marker 各条带及检测到的每个位点的迁移距离,用 SPSS 回归分析估测位点大小与迁移率之间的函数

表 1 文蛤不同种群名称及来源
Tab.1 The populations of *M. meretrix* and the codes

种群名称	代码	保种数量(kg)	试验样本数量	采样地点	采样时间
广西种群	GX	100	30	广西北海自然海区	2006 年 3 月
江苏种群	JS	150	30	江苏如东自然海区	2005 年 4 月
辽宁种群	LN	100	30	辽宁大连自然海区	2007 年 4 月

表 2 SRAP 引物序列
Tab.2 Sequence of SRAP primers

正向引物	序列(5'—3')	反向引物	序列(5'—3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	em7	GACTGCGTACGAATTCAA
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	em8	GACTGCGTACGAATTCTG

关系, 根据函数关系计算每个扩增位点的大小。统计相应结果。相关计算公式如下:

(1) 多态位点比例: $P_i = m_i/m$, 其中, m_i 为多态位点数, m 为总位点数。

(2) 隐性等位基因 a 的基因频率 q 是根据种群中隐性纯合个体(即对应某一扩增位点, 不出现该扩增带的个体)频率的平方根计算而来, 对应的显性等位基因 A 的基因频率(Jaccard, 1908): $p = 1 - q$,

文中提到的基因频率均为每位点显性等位基因的基因频率。

(3) 遗传相似系数(Nei, 1972): $S_{ij} = N_{ij} / [N_i + N_j + N_{ij}]$ 其中, S_{ij} 为任意两个个体间的遗传相似系数, N_{ij} 为 i 个体和 j 个体共享位点数, N_i 、 N_j 分别为 i 个体和 j 个体各自扩增的位点总数。种群间的遗传相似系数为两种群任意两个个体遗传相似系数的平均数。 S_{ij} 为两种群间的遗传相似系数; S_i 、 S_j 分别表示种群 i 和种群 j 的遗传相似系数。

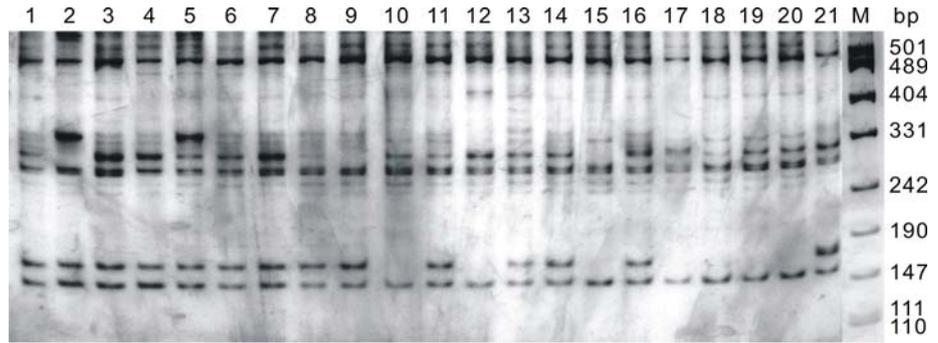


图 1 引物组合 me1-em5 对文蛤 3 种群的扩增结果

Fig.1 Result of PCR-amplification from primer combinations of me1-em5 in three *M. meretrix* populations
M: pUC19 DNA/MspI; 1—7: GX 种群; 8—14: JS 种群; 15—21: LN 种群

2 结果

2.1 不同引物组合对文蛤 3 种群的扩增结果

在 64 组引物中, 15 组引物可获得条带清晰、重复性强、多态性好的扩增结果, 对文蛤 3 种群扩增均可产生 8—21 个扩增位点, 部分个体扩增图谱见图 1, 平均每组引物可以产生 14.9 个扩增位点, 多态性位点数为 10.6 个(表 3), 显示了较高的多态性, 这表明 SRAP 技术可以成功应用于文蛤种质资源的遗传多样性分析。

表 3 文蛤 3 种群扩增位点数、多态位点比例

Tab.3 The number of amplified loci and the percentage of polymorphic loci in three *M. meretrix* populations

引物组	GX 种群		JS 种群		LN 种群		总种群	
	位点总数	多态位点数	位点总数	多态位点数	位点总数	多态位点数	位点总数	多态位点数
me1-em3	8	6	9	4	8	4	10	6
me1-em5	10	8	8	5	9	5	13	9
me2-em2	11	7	10	6	10	6	12	8
me2-em3	14	11	13	8	13	7	15	11
me2-em6	12	7	11	6	12	6	14	8
me3-em1	21	15	20	13	18	10	21	16
me3-em5	14	9	12	6	13	6	15	11
me3-em6	17	9	16	7	16	6	18	11
me4-em2	15	9	14	9	14	8	15	10
me4-em6	13	9	12	7	12	6	14	11
me4-em8	16	12	15	10	13	8	17	13
me5-em4	18	13	16	10	16	9	18	14
me5-em8	12	9	11	7	13	6	14	11
me7-em2	8	6	9	4	8	3	9	7
me8-em6	15	11	16	9	14	8	18	13
总计	204	141	192	111	189	98	223	159
多态位点比例	69.12%		57.81%		51.85%		71.30%	

2.2 文蛤 3 种群遗传相似系数与基因多样性指数

杂合度又称基因多样性，反应种群在数个座位上的遗传变异，一般认为它是度量种群遗传变异的一个最适参数，其大小可以反映种群遗传变异的高低。由表 4 可见，GX 种群遗传变异度更高，遗传多样性更为丰富，JS、LN 两个种群则相对较低。Shannon-wiener 多样性指数同样也是反应种群遗传多样性的物理量，该参数同样以 GX 种群最高。

表 4 文蛤 3 种群遗传相似度与基因多样性指数
Tab.4 Genetic similarity and gene diversity in each *M. meretrix* population

种群	杂合度	Shannon-wiener 指数
GX	0.2532	0.3649
JS	0.2162	0.3127
LN	0.1836	0.2714

2.3 文蛤 3 种群扩增位点显性基因型频率的分布规律

参照张全启等(2004)的方法，将各种群扩增位点的显性基因频率以 15% 为单位划分区间，0 和 100% 分别设为单独的区间，这样共设 8 个区间，统计各扩增位点显性基因频率在各区间的分布情况。显性基因频率在 1%—15% 区间 GX、JS、LN 3 种群扩增位点数分别为 49 个、28 个、13 个，显著性检验分析表明，GX 与 LN 两种群间差异极显著 ($P < 0.01$)，JS 与 GX、LN 两种群间差异显著 ($P < 0.05$)；而 0 和 100% 区间 GX 种群显著少于 JS、LN 两种群 ($P < 0.05$)，其它区间位点数分布 3 种群间无显著性差异(图 2)。结果表明，与 LN

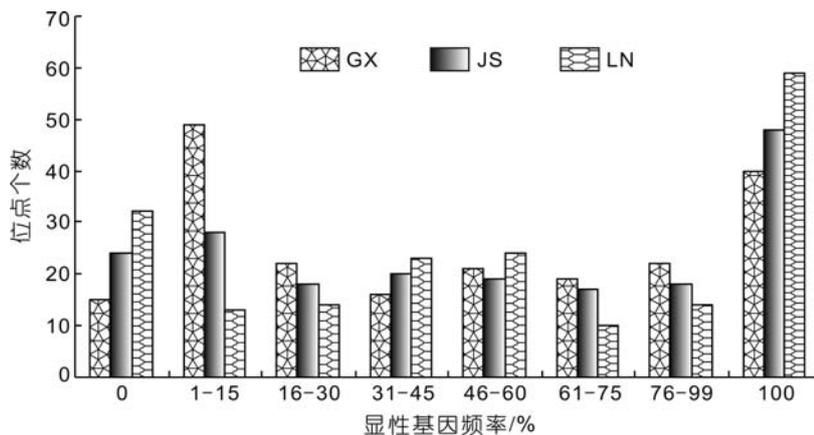


图 2 文蛤 3 种群扩增位点在不同显性基因型频率区间内的分布
Fig.2 Distributions of amplified loci in different frequency intervals of three *M. meretrix* populations

和 JS 两种群相比，GX 种群中低频位点显著增加，而隐性纯合基因位点显著减少，GX 种群中存在大量稀有等位基因。

3 讨论

3.1 SRAP 在文蛤种质资源研究中的适用性分析

SRAP(序列相关扩增多态)由于其独特的引物设计原则，以及简便、稳定、产率高、适用广泛、便于克隆目标片段等优点，已被广泛应用于作物种质资源研究。林忠旭等(2004)采用 30 个 SRAP 引物组合对棉花的两个品种进行了比较扩增，同时运用该技术对 11 份陆地棉材料进行了遗传多样性检测，显示了较高的多态性。潘俊松等(2005)运用 SRAP 标记构建了黄瓜的分子遗传连锁图谱，同时将始花节位性状控制基因定位在了第 1 连锁群上。Riaz 等(2001)用 SRAP 技术鉴定油菜的保持系和恢复系的遗传多样性，结果几乎和传统的系谱分类一致。Ferriol 等(2003, 2004)用此技术评价 69 份西葫芦的遗传多样性，将其分成两个亚种 8 个生态型，并用 AFLP 标记比较，发现在生态型变异性和生态型进化史上比 AFLP 更具有有一致性。在水产生物种质研究方面，丁炜东等(2008)运用该标记获得与草鱼种质退化相关的分子标记，并成功转化为 SCAR 标记；谢潮添等(2008)通过对 PCR 反应条件的优化，建立了坛紫菜 SRAP 标记分析的最佳反应体系，并利用该体系对 15 个坛紫菜种质材料进行了遗传多样性分析。本研究通过试验确定了

稳定性强、重复性高的文蛤 SRAP-PCR 反应体系，15 对引物在文蛤 3 种群共扩增 223 个位点，其中多态位点数为 159 个，多态性位点百分率为 71.30%，显示了较高的多态性。结果表明该标记同样适用于文蛤遗传多样性研究。

3.2 文蛤种质资源分析与保存、利用

随着现代生物技术的飞速发展，越来越多的分子标记被广泛应用于各种生物的种质资源分析中，这大大加快了其育种进程。文蛤广泛分布于我国沿海，是主要的海产经济贝类，其种质资源分析近年来逐渐开展，程汉良(2006)¹⁾采用 ITS 序列对我国沿海 4

1) 程汉良, 2006. 几种主要海洋经济帘蛤种质鉴定及种群遗传结构研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文

个地理种群文蛤的遗传结构进行研究时发现, 连云港、大连和湛江种群的单倍型间没有形成单独的分枝, 存在交叉, 而防城港种群虽未单独聚为一枝, 但与其它 3 种群分开。李太武等(2006)采用 ITS2 序列比较江苏和广西两个地区不同花纹文蛤群体的差异时发现广西文蛤群体和江苏文蛤群体间发生了遗传变异, 江苏文蛤群体内部也发生了遗传分化。COI 序列结果表明防城港种群与其它种群间不同单倍型之间序列差异较大, 大连、连云港及湛江 3 个种群间差异较小(程汉良等, 2007)。以上结果表明, 我国文蛤不同地理种群存在明显的遗传分化, 但所测为核糖体或线粒体 DNA 序列, 均反映核外 DNA 遗传变异水平。在核 DNA 遗传变异的研究中, RAPD、ISSR、AFLP 揭示我国沿海文蛤的遗传多样性较为丰富, 遗传变异也较大, 不同地理种群间存在遗传分化(沈怀舜等, 2003; 陈大鹏等, 2004; 林志华等, 2008), 本研究结果与之相一致。同时, 与江苏、辽宁种群相比, 文蛤广西种群遗传多样性更为丰富, 比较不同种群各扩增位点显性基因频率在各区间的分布发现, 广西种群中低频位点显著增加, 而隐性纯合基因位点显著减少, 表明广西种群中存在大量稀有等位基因, 种质更优。

目前文蛤养殖的苗种主要依靠自然苗种, 即使有人工繁殖的苗种, 其亲本也都是未经人工选育的野生型文蛤, 其遗传极不稳定。选择育种是人类以改进养殖种类有益性状为目的的选种、选配和培育工作。近年来, 利用传统的选择和杂交手段及分子标记辅助育种技术开展贝类的遗传改良研究已在皱纹盘鲍和海湾扇贝等不同生殖类型的贝类上取得显著成果(张国范等, 2006)。同时, 贝类育种评估和分析系统的开发与应用为贝类良种培育提供了有效的方法与技术手段, 但是它们在选择育种中仅作为工具, 自身不会产生所需要的遗传进展, 具有不同表型性状和遗传背景的实验材料是选择和杂交育种的基础, 也是实现谱系化的前提。选择育种基础群的建立是文蛤种质改良首要解决的问题, 以大量的理论研究为基础, 文蛤广西种群作为选择育种的基础群更为合适。不同地理种群的原种保存、具有优良性状繁殖亲本的良好选育、健康苗种培育是文蛤养殖业可持续发展的必由之路。

参 考 文 献

丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明, 2008. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记. 动物学报, 54(3): 475—481

- 王晓梅, 刘保忠, 相建海, 2009. 文蛤(*Meretrix meretrix*)幼虫发育过程中细胞凋亡和 Caspase 功能分析. 海洋与湖沼, 40(2): 181—186
- 刘雅辉, 闫红飞, 杨文香等, 2008. 23 个小麦抗叶锈病近等基因系 SRAP 多态性. 中国农业科学, 41(5): 1333—1340
- 李太武, 张安国, 苏秀榕等, 2006. 不同花纹文蛤(*Meretrix meretrix*)的 ITS2 分析. 海洋与湖沼, 37(2): 132—137
- 吴伟怀, 王 玲, 何艺郡等, 2004. 稻瘟病菌种群的分子遗传学研究——广东省与江苏省稻瘟病菌种群遗传及致病型结构的比较分析. 中国农业科学, 37(11): 1628—1635
- 沈怀舜, 朱建一, 丁亚平等, 2003. 我国沿海三个文蛤地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 25(5): 98—102
- 张全启, 徐晓斐, 齐 洁等, 2004. 牙鲆野生种群和养殖种群的遗传多样性分析. 中国海洋大学学报, 34(5): 816—820
- 张志伟, 韩曜平, 曹哲明等, 2007. 草鱼野生群体和人工繁殖群体遗传结构的比较研究. 中国水产科学, 14(5): 720—725
- 张国范, 刘 晓, 2006. 关于贝类遗传改良几个问题的讨论. 水产学报, 30(1): 130—137
- 陈大鹏, 沈怀舜, 丁亚平等, 2004. 文蛤(*Meretrix meretrix*)地理种群 ISSR 分子标记的初步研究. 南京师大学报, 27(3): 74—77
- 林志华, 董迎辉, 李 宁等, 2008. 基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析. 海洋与湖沼, 39(3): 245—251
- 林志华, 黄晓婷, 董迎辉等, 2009. 广西文蛤(*Meretrix*)的 fAFLP 及 ITS 分析. 海洋与湖沼, 40(1): 33—41
- 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 2004. 新型标记 SRAP 在棉花 F₂ 分离种群及遗传多样性评价中的适用性分析. 遗传学报, 31(6): 622—626
- 程汉良, 夏德全, 吴婷婷等, 2007. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 COI 基因片段序列分析. 海洋学报, 29(5): 109—116
- 谢潮添, 陈昌生, 纪德华等, 2008. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)SRAP 分子标记体系的构建及种质材料的遗传分析. 自然科学进展, 18(3): 247—253
- 潘俊松, 王 刚, 李效尊等, 2005. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位. 自然科学进展, 15(2): 167—172
- Ferriol M, Pico B, Cordova F P *et al*, 2004. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. Crop Science, 44: 653—664
- Ferriol M, Pico B, Nuez F, 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. Theor Appl Genet, 107(2): 271—282
- Jaccard P, 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Socimété Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223—270
- Li G, Quiros C F, 2001. Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in

- Brassica*. Theor Appl Genet, 103: 455—461
- Nei M, 1972. Genetic distance between populations. Amer Naturalist, 106: 283—292
- Riaz A, Li G, Quresh Z *et al*, 2001. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. Plant Breeding, 120(5): 411—415
- Snowdon R J, Friedt W, 2004. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. Plant Breeding, 123: 1—8

SRAP ANALYSIS ON GERMPLASM OF WILD *MERETRIX MERETRIX* OFF CHINESE COASTS

ZHANG Zhi-Wei¹, CHEN Ai-Hua¹, YAO Guo-Xing¹, WU Jian-Ping¹,
WU Yang-Ping¹, XU Guang-Ping¹, CHENG Han-Liang²

(1. Jiangsu Institute of Marine Fishery, Nantong, 226007; 2. College of Marine Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, 222005)

Abstract Genetic variation of three wild stocks of *Meretrix meretrix* was analyzed using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. Samples were collected in Guangxi (GX), Jiangsu (JS), and Liaoning (LN) provinces and kept in Hard Clam National Breeding Plant in China. Fifteen primer pairs produced 159 polymorphic loci in average of 10.6 loci per primer pair. The percentage of polymorphic loci was 71.30%, suggesting a rich genetic diversity among the wild resources. The percentage of polymorphic loci in Populations GX, JS, and LN was 69.12%, 57.81%, and 51.85%; the average heterozygosity of population was 0.253, 0.216, 0.184; and the Shannon-Wiener index was 0.365, 0.313, 0.271, respectively. The results indicate that Population GX had the highest genetic diversity among three populations, and a large amount of low frequency alleles indicated by noticeable increase in the number of rare loci and decrease in the number of homozygous recessive loci; therefore, the population is potential for genetic improvement of breed.

Key words *Meretrix meretrix*, Germplasm, SRAP