

方斑东风螺2个养殖群体遗传变异的RAPD分析

尹绍武, 冯永勤, 黄海, 廖经球, 高磊

(海南大学 海洋学院, 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要:运用 RAPD 技术对方斑东风螺 (*Babylonia areolata* Lamarck) 泰国养殖群体和海南养殖群体的遗传多样性进行研究。选取 21 个 10 bp 随机引物对方斑东风螺 2 个群体各 20 个个体进行 RAPD 分析, 21 个引物共检测出 222 条带。泰国养殖群体的多态位点比例为 70.27%, Shannon 多样性信息指数为 0.1858, Nei's 基因多样性指数为 0.2491, 群体内个体间平均遗传相似率为 0.7920, 平均遗传距离为 0.2080; 海南养殖群体的多态位点比例为 73.87%, Shannon 信息指数为 0.2044, Nei's 基因多样性指数为 0.2615, 群体内个体间平均遗传相似率为 0.7620, 平均遗传距离为 0.2380。群体内遗传变异占种内遗传变异的 76.81%, 群体间遗传变异占 23.19%。以上分析表明, 方斑东风螺泰国养殖群体和海南养殖群体的遗传多样性水平仍较高, 但海南群体的遗传多样性水平比泰国群体要高。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 667-671]

关键词: 方斑东风螺; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S968.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)04-0667-05

方斑东风螺 (*Babylonia areolata* Lamarck) 属腹足纲 (Gastropoda), 蛾螺科 (Buccinidae), 身体呈长卵圆形, 螺旋部呈圆锥状, 体螺层膨大, 壳质厚而坚实, 壳表光滑, 色白具褐黄色方形斑块, 生活于水深 7~30 m 的砂质海底^[1], 是热带、亚热带贝类品种, 在泰国、日本、中国均有分布, 在中国主要分布在福建、广东、广西、海南和台湾沿海^[2-3]。方斑东风螺生长速度快, 抗病能力强, 具有较高的经济和营养价值, 已发展为一个新兴的海水养殖品种。目前, 福建、广东、海南、台湾等地已初步实现方斑东风螺人工育苗规模化和养殖产业化, 但至今尚未见方斑东风螺遗传多样性的研究报道。

随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术具有快速、灵敏、简便等特点^[4-5], 已被广泛应用于遗传多样性检测及品系鉴定等多个方面。本研究采用 RAPD 技术对目前在海南省已实现规模化养殖的方斑东风螺泰国养殖群体和海南养殖群体的遗传多样性进行分析, 研究其遗传背景, 以期从 DNA 水平了解方斑东风螺养殖群体的遗传资源现状, 为其资源的合理利用和保护提供依据, 促进其产业化的健康和可持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用方斑东风螺泰国养殖群体样本和海南养殖群体 ($n=50$) 分别由海南定大养殖有限公司和海南省水产研究所养殖基地提供, 于 2005 年 6 月运回实验室暂养于水族缸中, 体质量为 68~140 g。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取方法采用酚-氯仿提取法。随机取方斑东风螺样本各 20 只, 各取新鲜腹足 0.1 g 左右, 用灭菌的 0.8% 生理盐水漂洗 1~2 min, 再用小剪刀剪碎腹足, 加入 500 μ L DNA 提取液 (10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0)、10% SDS 40 μ L, 轻轻摇匀后, 在 37 $^{\circ}$ C 下水浴 2~3 min; 然后再加入蛋白酶 K (25 mg/mL) 40 μ L, RNase (60 U/mg) 2 μ L 摇匀后在 55 $^{\circ}$ C 下水浴消化过夜 (18~19 h)。加入等体积饱和酚抽提 20 min 后, 在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液加入等体积酚+氯仿+异戊醇混合液 (体积比 25:24:1) 抽提 10 min 后在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液加入等体积的氯仿+异戊醇混合液抽提 10 min 后在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min

收稿日期: 2006-07-29; 修订日期: 2006-11-08。

基金项目: 海南省重点科技计划项目 (06121)。

作者简介: 尹绍武 (1969-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为水生经济动物种质资源与遗传育种。E-mail: yinshaowu@163.com

min 离心 15 min; 加入灭菌的 2.5 mol/L 的 NaCl 使 NaCl 的终浓度为 0.3 mol/L, 摇匀后加入大于 2 倍体积的无水乙醇, 在 -20 ℃ 下放置 15 min, 然后在 4 ℃ 下 14 000 r/min 离心 20 min; 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 自然晾干后加入 200 μL TE 液溶解, 置于 4 ℃ 保存备用。然后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, 估计其分子量的大小, 在核酸蛋白测定仪上测其 DNA 含量及纯度。

1.3 RAPD 扩增

RAPD 反应总体积为 25 μL, 其中含 10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL; MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL; 模板 DNA 1 μL (80~200 ng); Taq 酶 (5 U) 0.3 μL; dNTP (各 1.0 mmol/L) 5 μL; 引物 1.5 μL (约 15 ng)。PCR 反应在德国 Eppendorf 公司的 Mastercycler 型扩增仪上进行, 94 ℃ 预变性 10 min 后进行 40 个循环, 每个循环包括 94 ℃ 变性 1 min, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 最后于 72 ℃ 再延伸 10 min。反应结束后 4 ℃ 保存, 每次反应设不含模板 DNA 的反应体系作为空白对照。扩增产物用含有溴化乙锭的 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳, 用 Alphamager™2200 凝胶成像系统拍照、观察记录。

1.4 数据处理

根据观察结果, 如有扩增条带且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建原始数据表征矩阵, 并据此统计位点总数和多态位点比例, 分析和计算群体的遗传多样性参数。

多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数}$ 。Nei 基因多样性指数 $H_e = \sum (1 - \sum P_i^2) / n$, P_i 为单个位点上的等位基因的频率; n 为所检测到的位点数 [6]。

群体遗传相似率和遗传距离用下列公式计算: $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$; $D = 1 - S$, 式中 S 为群体任意两个个体间遗传相似率; D 为两个个体间遗传距离; N_x 和 N_y 分别为 x 和 y 个体拥有的 RAPD 标记总数, N_{xy} 是 x 和 y 两个个体共享 RAPD 标记数 [7]。

用 Shannon 多样性指数 H 来分析和计算群体内的平均遗传多态度 (H_{pop}) 和总遗传多态度 (H_{sp})。 $H = - \sum P_i \ln P_i / N$ (P_i 为第 i 条扩增条带存在的频率; N 为检测到的位点数)。 $H_{pop} = \sum H / n$, $H_{sp} = - \sum (X \ln X) / n$, n 为群体数, X 为 n 个群

体的综合表型频率。分别以 H_{pop} / H_{sp} 和 $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 评估群体内和群体间的遗传变异比例。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

本研究从 100 个随机引物 (S1~S100) 中筛选出扩增带清晰、重复性好的引物 21 个 (引物序列见表 1), 各引物扩增的带数在 4~16 之间, 共产生 222 个重复性好且带型清晰的 RAPD 扩增带, 平均每个引物扩增出 10.57 条, 其长度在 200~2 200 bp 之间。图 1 是引物 S98 对方斑东风螺 2 个养殖群体的 RAPD 扩增结果。

表 1 稳定扩增的随机引物序列

Tab.1 Sequences of stably amplified random primers

引物 Primer	5' - 3' 序列 5' - 3' sequence	引物 Primer	5' - 3' 序列 5' - 3' sequence
S5	TGCGCCCTTC	S75	GACGGATCAG
S6	TGCTCTGCCC	S76	CACACTCCAG
S8	GTCCACACGG	S79	GTTGCCAGCC
S23	AGTCAGCCAC	S82	GGCACTGAGG
S48	GTGTGCCCCA	S83	GAGCCCTCCA
S50	GGTCTACACC	S89	CTGACGTCAC
S62	GTGAGGCGTC	S94	GGATGAGACC
S68	TGGACCGGTG	S95	ACTGGGACTC
S69	CTCACCGTCC	S97	ACGACCGACA
S71	AAAGCTGCGG	S98	GGCTCATGTG
S73	AAGCCTCGTC		

2.2 方斑东风螺群体内遗传多样性分析

在扩增获得的 222 条 RAPD 扩增带中, 泰国群体有 156 条带表现为多态, 多态位点比例为 70.27%, 海南群体有 164 条带表现为多态, 多态位点比例为 73.87%。泰国养殖群体的平均遗传相似率为 0.792 0, 平均遗传距离为 0.208 0, Shannon 多样性指数为 0.185 8, Nei 氏基因多样性指数为 0.249 1; 海南养殖群体的平均遗传相似率为 0.762 0, 平均遗传距离为 0.238 0。Shannon 多样性指数为 0.204 4, Nei 基因多样性指数为 0.261 5 (表 2)。

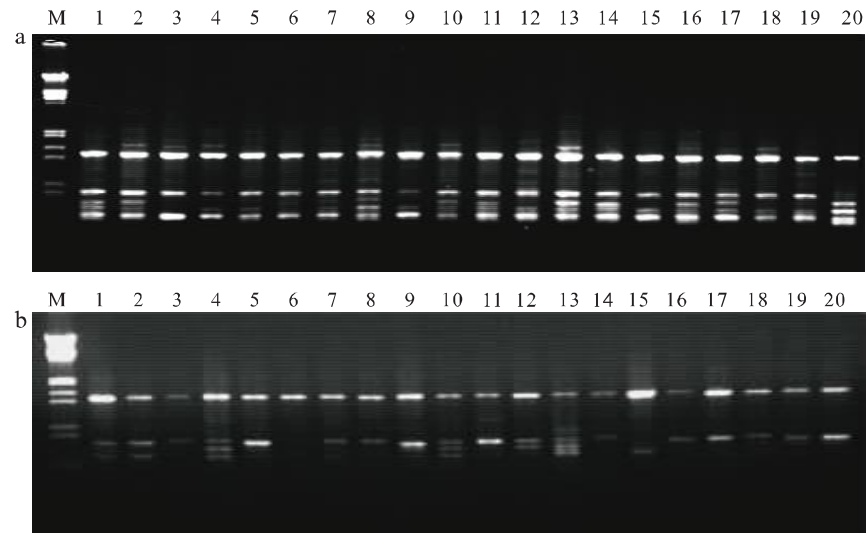


图 1 引物 S98 对泰国产方斑东风螺和海南产方斑东风螺养殖群体的 RAPD 扩增结果
注:M 为标准分子量;1~20 表示各群体中的个体;a 为泰国产方斑东风螺养殖群体;b 为海南产方斑东风螺养殖群体.

Fig.1 RAPD results of cultured populations of *B. areolata* from Thailand and Hainan of China with primer S98

Note: M is λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III Marker, 1 - 20 represent individuals from the two populations; a: from Thailand population; b: from Hainan population.

表 2 方斑东风螺两群体遗传多样性分析

Tab.2 Genetic diversity in the two populations of *B. areolata*

群体 Population	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点比例 / % Percentage of polymorphic loci	遗传相似率 Genetic similarity	遗传距离 Genetic distance	Shannon 多样性指数 Shannon's diversity index	Nei 基因多样性指数 Nei's genetic diversity index
泰国群体 Thailand population	156	70.27	0.792 0	0.208 0	0.185 8	0.249 1
海南群体 Hainan population	164	73.87	0.762 0	0.238 0	0.204 4	0.261 5

2.3 方斑东风螺群体间遗传变异分析

利用 Shannon 多样性指数可分析群体内和群体间的遗传多样性,从而揭示遗传变异在群体内和群体间的分布。由表 3 可知,方斑东风螺群体内的总遗传多态度 (H_{sp}) 为 0.253 6,群体内的平均遗传多态度 (H_{pop}) 为 0.195 1。遗传多样性在群体内的分布比率 (H_{pop}/H_{sp}) 约为 0.768 1,在群体间的分布比率 ($(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$) 约为 0.231 9。即方斑东风螺群体发生的遗传变异有 76.81% 存在于群体内, 23.19% 的变异存在于群体间。

3 讨论

方斑东风螺是中国南方重要的经济贝类,是海水贝类养殖的重要种类之一,保护该物种的种质资源,对促进东风螺产业的稳定、持续发展意义重大。鱼、虾、贝类等养殖群体往往由于人为因素的干扰,导致群体遗传多样性水平下降,进而导致生长率、抗病性和繁殖力等性能下降,甚至危及种群的生存。华丹等^[9]对野生三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 和养殖三角帆蚌进行 RAPD 分析,发现其种内相似系数分别为 0.787 0 和 0.833 0,显示野生种群基因组

发生的变异较养殖种群大。Beth 等^[10]应用 RAPD 技术对 1 个养殖群体和 4 个野生群体的牡蛎 (*Crasostrea virginica*) 遗传多样性进行了研究, 结果表明, 野生群体多态位点比例为 74%, 明显高于养殖群体 (54%)。本研究对方斑东风螺泰国养殖群体和海南养殖群体的遗传多样性进行 RAPD 分析, 结果表明, 海南养殖群体的遗传多样性高于泰国养殖群体的遗传多样性, 这可能与海南养殖群体选育历史短, 而泰国养殖群体已经过多代的人工养殖和定向选择有关。但由于没有方斑东风螺野生群体遗传多样性的资料比较, 很难判断养殖群体受人工养殖干扰的程度, 但与中国其他贝类遗传多样性的 RAPD 分析结果进行横向比较可以看出, 方斑东风螺养殖群体的多态位点比例高于皱纹盘鲍^[11] (*Haliotis*

discus hannai)、杂色鲍^[12] (*Haliotis diversicolor*), 接近栉孔扇贝^[13] (*Chlamys farreri*)、泥蚶^[17] (*Tegillarca granosa*)、缢蛏^[16] (*Sinonovacula constricta*)、青蛤^[18] (*Cyclina sinensis*), 略低于文蛤^[14] (*Meretrix meretrix*)、马氏珠母贝^[15] (*Pinctada martensii*)。因此, 可以初步判断方斑东风螺养殖群体仍具有较高的遗传多样性, 种质资源尚处于较好状态。这一结果可为方斑东风螺资源的进一步选种育种提供科学参考。因此, 为最大限度地保护与利用开发东风螺资源, 在保护野生资源的前提下, 尽可能保证人工育苗过程各环节的科学性和合理性, 尽快将分子遗传标记技术应用于东风螺苗种培育, 建立标记辅助选育技术, 以促进东风螺人工养殖业的更快地发展。

表 3 方斑东风螺遗传多样性在群体内和群体间的分布

Tab.3 Distribution of genetic diversity within and between the two *B. areolata* populations

引物 Perimer	泰国群体 Shannon 多样性指数 Shannon index of Thailand population	海南群体 Shannon 多样性指数 Shannon index of Hainai population	群体内遗传多样性 H_{pop}	种内总遗传多样性 H_{sp}	群体内遗传多样性所占比率 H_{pop}/H_{sp}	群体间遗传多样性所占比率 $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$
S5	0.238 3	0.258 6	0.248 6	0.306 5	0.811 1	0.189 9
S6	0.279 9	0.263 4	0.271 7	0.381 2	0.712 7	0.287 3
S8	0.131 5	0.155 0	0.143 2	0.186 5	0.767 8	0.232 2
S23	0.068 6	0.082 4	0.075 5	0.102 4	0.740 2	0.259 8
S48	0.183 0	0.237 7	0.210 3	0.268 4	0.783 5	0.216 5
S50	0.243 2	0.251 4	0.246 3	0.309 6	0.795 5	0.204 5
S62	0.189 7	0.215 4	0.202 6	0.265 3	0.763 5	0.236 5
S68	0.078 0	0.102 1	0.090 1	0.112 3	0.801 9	0.198 1
S69	0.312 0	0.312 9	0.312 6	0.391 0	0.799 5	0.200 5
S71	0.158 9	0.169 0	0.164 0	0.211 2	0.776 5	0.223 5
S73	0.243 8	0.265 4	0.254 6	0.318 9	0.798 4	0.201 6
S75	0.244 8	0.257 8	0.251 3	0.323 2	0.777 5	0.222 5
S76	0.198 4	0.231 0	0.214 7	0.271 4	0.791 1	0.208 9
S79	0.321 9	0.331 0	0.326 5	0.421 1	0.775 3	0.224 7
S82	0.114 7	0.125 8	0.120 6	0.165 6	0.728 3	0.271 7
S83	0.164 7	0.201 4	0.183 1	0.241 6	0.757 9	0.242 1
S89	0.236 8	0.258 7	0.247 8	0.341 2	0.726 3	0.273 7
S94	0.104 7	0.115 4	0.110 1	0.143 1	0.769 4	0.230 6
S95	0.154 4	0.167 8	0.161 1	0.207 9	0.774 9	0.225 1
S97	0.101 2	0.143 5	0.122 4	0.160 3	0.763 6	0.236 4
S98	0.134 3	0.147 2	0.140 8	0.196 7	0.715 8	0.284 2
平均 Average	0.185 8	0.204 4	0.195 1	0.253 6	0.768 1	0.231 9

参考文献:

- [1] 蔡英亚. 贝类学概论 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 234-245.
- [2] 吴善. 方斑东风螺的产卵和幼贝培育 [J]. 中国水产, 2000 (1): 40-42.
- [3] 刘永, 梁飞龙, 毛勇, 等. 方斑东风螺的人工育苗高产技术 [J]. 水产养殖, 2005, 25 (2): 22-25.
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Liavak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (22): 6 531-6 535.
- [5] Welsh J, Mmclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 7 213-7 218.
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 19: 583-590.
- [7] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478-484.
- [8] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- [9] 华丹, 顾若波, 白云飞, 等. RAPD 分析野生和养殖三角帆蚌的遗传多样性 [J]. 水产学报, 2003, 27 (6): 540-544.
- [10] Beth M H, Arun K, Dhar K R, et al. Genetic diversity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Massachusetts using the RAPD technique [J]. J Shellfish Res, 1999, 18 (1): 121-125.
- [11] 李莉, 常林瑞, 孙振兴, 等. 皱纹盘鲍遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 海洋水产研究, 2006, 27 (1): 59-63.
- [12] 李太武, 杨文新, 宋林生, 等. 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 和杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve) 遗传多样性的 RAPD 研究 [J]. 海洋与湖沼, 2003, 34 (4): 443-449.
- [13] 宋林生, 李俊强, 李红蕾, 等. 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其遗传分化的研究 [J]. 高技术通讯, 2002, 7: 83-86.
- [14] 杜晓东, 邓岳文, 叶富良, 等. 广东和广西地区野生文蛤的遗传多样性 [J]. 中国水产科学, 2004, 11 (1): 41-47.
- [15] 丁小雷, 邓凤姣, 王爱民, 等. 野生马氏珠母贝子一代的遗传多样性 [J]. 动物学杂志, 2003, 38 (1): 2-7.
- [16] 李成华, 李太武, 宋林生, 等. 4 个缢蛏群体遗传结构的 RAPD 分析 [J]. 水产科学, 2004, 23 (12): 26-28.
- [17] 李太武, 李成华, 宋林生, 等. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, 2003, 11 (2): 118-124.
- [18] 么宗利, 周凯, 来琦芳, 等. 我国五个青蛤地理群体遗传变异 RAPD 分析 [J]. 海洋渔业, 2005, 27 (2): 102-108.

Genetic diversity of two cultured populations of *Babylonia areolata* revealed by RAPD analysis

YIN Shao-wu, FENG Yong-qin, HUANG Hai, LIAO Jing-qi, GAO-Lei

(College of Ocean, Hainan University; Ministry of Education, Key Laboratory for Tropical Biology Resources, Haikou 570228, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to assess the genetic diversity of two cultured populations of *B. areolata* from Thailand and Hainan of China, respectively. Twenty individuals from each population were randomly selected. Twenty-one random primers were used and 222 bands were generated. The results showed that in the Thailand population the percentage of polymorphic fragments was 70.27; Shannon's index of phenotypic diversity was 0.185 8; Nei's index of gene diversity was 0.249 1; the mean genetic similarity was 0.792 0, and the mean genetic distance was 0.208 0. In Hainan population the percentage of polymorphic fragments was 73.87%; Shannon's index of phenotypic diversity was 0.204 4; Nei's index of gene diversity was 0.261 5; the mean genetic similarity was 0.762 0, and the mean genetic distance was 0.238 0. The percentage of genetic variations which came from the inside of the population was 76.81%, and that came from the outside of the population was 23.19%. Based on the results, the genetic diversity of the two populations of *B. areolata* from Thailand and Hainan were in good condition. However, the level of genetic diversity of Hainan population was higher than that of Thailand population. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 667-671]

Key words: *Babylonia areolata*; genetic diversity; RAPD