

合浦珠母贝 3 个养殖群体的 RAPD 分析

苏天凤¹, 蔡云川², 张殿昌³, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070; 3. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 利用 RAPD 标记技术检测了广西省北海市、海南省三亚市、广东省深圳市等 3 个地理种群养殖合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*) 基因组 DNA 的多态性, 并对其遗传结构进行了初步分析。从 40 个随机引物中筛选出 13 个 10 bp 引物, 它们在 3 种群中共扩增出了 140 条 DNA 片段, 3 种群共有片段 16 条, DNA 片段数分别为 58、91 和 71 条, 多态性位点比例分别为 41.4%, 65.0% 和 58.4%。遗传距离分析表明, 广西种群与广东种群的亲缘关系较近, 而与海南种群亲缘关系较远。13 个引物中, 引物 S₁₁ 和 S₃₅₈ 扩增出的 3 种群指纹图谱差异显著, 可作为 3 种群鉴定的分子标记。

关键词: 合浦珠母贝; 养殖种群; RAPD; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: Q959.215; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)02-0106-04

合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*) 是我国生产海水珍珠主要的母贝^[1], 由于多年的人工繁殖生产, 出现了个体小型化、抗病能力差、育珠质量低等种质退化现象, 其品种亟待改良^[2,3]。本研究利用 RAPD 技术对 3 个不同地理种群的养殖合浦珠母贝基因组 DNA 进行了遗传分析, 并对其种群结构进行了初步研究。目前国内在海洋生物种群遗传结构的研究方面只有刘必谦等^[4]、宋林生等^[5,6]对大连湾牡蛎、对虾作过初步研究, 王爱民等^[7]在早期对合浦珠母贝的天然群体遗传多样性进行了研究。本实验对 3 种养殖种群的合浦珠母贝进行 RAPD 研究, 以期探索在分子水平上进行种质鉴定、品种改良及种质资源保护的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 合浦珠母贝 分别取自广西北海、海南三亚、广东深圳的珍珠养殖场。其地理分布见图 1。

取回后活体置超低温冰箱 -72℃ 保存备用。每 1 群体随机抽取 6 只提取基因组 DNA 用于分析。

1.1.2 试剂 琼胶和 DNA 标记为宝生物工程大连有限公司产品, 其他分子生物学试剂均为上海生工公司产品。

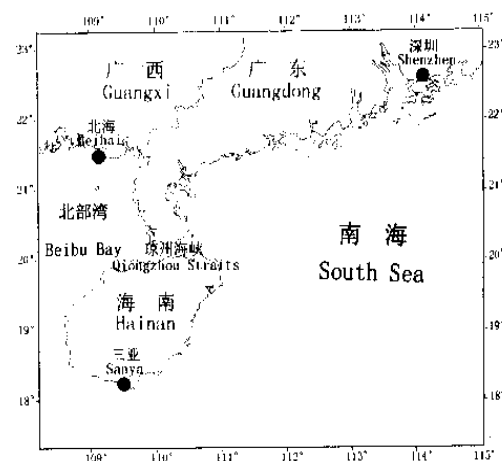


图 1 采样地点

Fig. 1 Sampling sites

收稿日期: 2001-06-08.

基金项目: 中国水产科学研究院基金资助(99-08-01).

作者简介: 苏天凤(1969-), 女, 助理研究员, 从事渔业生物技术。

通讯作者: 江世贵。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 取-72℃的贝稍融,撬开贝壳,用干净解剖刀切取闭壳肌,尽量避开外套膜组织,加液氮研磨至粉末,称1g粉末加入10ml细胞裂解液(50 mmol/L Tris·HCl, pH 9.0, 100 mmol/L EDTA, 200 mmol/L NaCl)。混匀后加入终质量分数为0.02的SDS和5mg蛋白酶K,55℃保温4h,等体积饱和酚抽提1次,等体积混合液(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)抽提2次或多次直至中间无蛋白质层,氯仿抽提1次后加入1/10体积5 mol/L NaCl,0.6倍体积异丙醇沉淀DNA,70%的乙醇洗涤多次,100%乙醇洗涤2次,干燥后加双蒸水溶解,-4℃保存。

1.2.2 RAPD反应 扩增反应总体积20 μl。其中包括1×扩增缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 0.001%的明胶), 200 μmol/L的dNTPs, 引物15 ng, 25 mmol/L MgCl₂, 1 U TaqDNA聚合酶, 15~200 ng基因组DNA。在扩增仪(德国bio-metra公司出品)上反应。扩增参数为:94℃预变性5 min, 94℃ 3 min, 34℃ 3 min, 72℃ 3 min, 4个循环;94℃ 1 min, 34℃ 1 min, 72℃ 2 min, 33个循环;最后72℃延伸8 min。每次反应均设不含模板DNA的空白对照。同一反应间隔3个月后进行重复实验。

1.2.3 电泳观察 扩增产物用2%琼胶电泳分离(1×TBE, 3 V/cm恒压, 约4 h), EB染色, 紫外透射仪观察和拍照。

1.3 数据分析

根据Apostol等^[8]假设,将RAPD标记作为等位基因进行多态分析,多态位点比例 $p = \text{多态扩增片段}/\text{扩增片段总数}$ 。任意2个体间的遗传相似性和遗传距离根据Lynch^[9]的公式计算:经电泳获得RAPD图谱,在同一电泳迁移位置上,有DNA扩增条带的计为1,没有的计为0。 F 为遗传相似性,按公式 $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 计算; P 为遗传距离,按公式 $P = 1 - F$ 计算。其中: N_{xy} 为个体 X 和 Y 共同拥有的带数; N_x 和 N_y 分别为个体 X 和 Y 的所具有的扩增带数。

2 结果

2.1 RAPD扩增结果

缺少DNA模板的对照中,均无扩增带。重复实验结果一致。本研究所使用的40个引物中,13个引物的扩增效果较好,其他引物或过于模糊或重复性差而不计。单一引物扩增条带数为1~11条(表1),扩增片段长度多在100~2 000 bp。13条引物共产生140个标记(DNA片段)。广西北海合浦珠母贝(下称广西贝)、海南三亚合浦珠母贝(简称海南贝)及广东深圳合浦珠母贝(简称深圳贝)3种群的DNA标记数分别为58、91和76个,其中16条带(9%)为3种合浦珠母贝所共有,广西贝、海南贝、深圳贝多态位点百分率分别为41.4%, 65.0%, 58.4%,显示了较为丰富的多态性。

表1 13个多态随机引物的DNA序列及其扩增结果

Table 1 Sequences and amplified results of 13 random primers

引物序号 Primer No.	序列 5'→3' Sequence 5'→3'	扩增带数 Amplified bands	引物序号 Primer No.	序列 5'→3' Sequence 5'→3'	扩增带数 Amplified bands
S ₁	GTTCGCTCC	5~9	S ₁₄	TCCGCTCTGG	4~7
S ₃	CATCCCCCTC	1~5	S ₁₅	GGAGGGTGTT	1~6
S ₄	GGACTGGAGT	5~7	S ₁₆	TTTGCCCGGA	4~10
S ₅	TGCGCCCTTG	5~9	S ₁₇	AGGGAACGAG	9~11
S ₆	TGCTCTGCCC	4~7	S ₃₄₄	CCGAACACGG	2~4
S ₁₀	CTGCTGGGAC	4~7	S ₃₅₈	TGGTCGCAGA	4~5
S ₁₁	GTAGACCCGT	3~5			

2.2 RAPD分子标记

13个引物中, S₁₁和S₃₅₈扩增的3种群的DNA指纹图谱差异非常明显(图2)。引物S₁₁的扩增片段1 900 bp, 670 bp和S₃₅₈扩增片段620 bp为海南贝所独有的特异片段;引物S₁₁的扩增片段410 bp

为广西贝独有的特异片段;引物S₁₁的扩增产物在800 bp左右有2条片段为深圳贝所独有。这6个片段都具有种群的特异性,因此可作为鉴定这3种群的分子标记。

2.3 3种群遗传多样性分析

3种群合浦珠母贝之间的遗传相似性指数和遗传距离见表2。

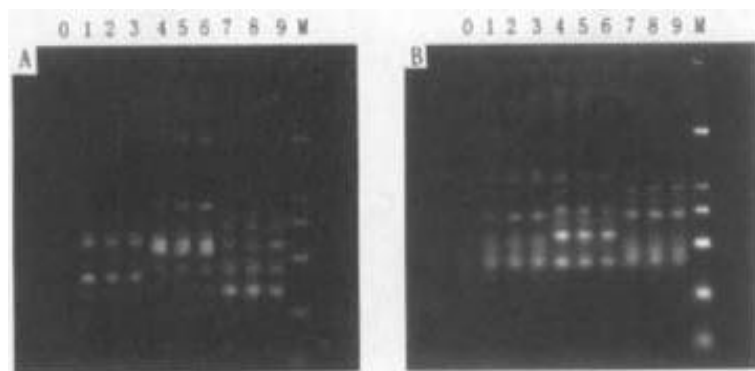


图2 3种群合浦珠母贝引物 S_{11} (A) 和 S_{358} (B) 扩增的 RAPD 结果

Fig. 2 RAPD results of three *Pinctada martensii* populations with primers S_{11} (A) and S_{358} (B)

1~3 为广西种群, 4~6 为海南种群, 7~9 为广东种群, M 为 DNA 标记。

Nos. 1-3 are populations of Guangxi; Nos. 4-6 are populations of Hainan; Nos. 7-9 are populations of Guangdong; M is DNA marker.

表2 3种群合浦珠母贝之间的遗传相似性指数和遗传距离
Table 2 Genetic similarity indices and genetic distance among three populations

样品 Sample	广西种群 Population of Guangxi	海南种群 Population of Hainan	深圳种群 Population of Shengzhen
广西种群 Population of Guangxi	—	0.355*	0.388*
海南种群 Population of Hainan	0.645**	—	0.365*
深圳种群 Population of Shengzhen	0.612**	0.635**	—

注: *—遗传相似性指数 Similarity indices

**—遗传距离 Genetic distance

遗传相似性指数表明, 广西种群与深圳种群较相似(0.388), 深圳种群与海南种群次之(0.365), 广西种群与海南种群差异稍大(0.355)。总的说来, 3种群虽有一定的相似性, 但相似性指数还是偏小。种群间遗传距离反映了生物间亲缘关系的远近程度。3种群间广西种群与海南种群亲缘关系较远(0.645), 其次是深圳种群与海南种群(0.635), 亲缘关系较近的是广西种群同深圳种群(0.612)。

3 讨论

实验显示, 3个不同地理种群合浦珠母贝具有较高的多态性, 3群体相比较, 海南三亚种群多态位点百分率最高, 为65.0%, 同时还发现海南三亚种

群每1条引物扩增产物最多, 总数也是最多, 为91条。王爱民^[7]认为, 海南三亚、海南洋浦港和广西涠洲岛的野生合浦珠母贝群体内遗传多样性最高的是海南三亚种群, 表明该种群的合浦珠母贝无论野生或养殖群体, 遗传多样性都相对丰富, 颇具选育种的潜力, 提示养殖工作者在进行品种改良时, 可先从海南三亚种群中寻找有用的基因。

按 Lynch^[9]的方法计算, 3种群间的遗传距离最大为0.645, 其次为0.635, 最小为0.612。3种群间虽有一定的基因交流, 具备一定的亲缘关系, 但亲缘关系均较远, 说明合浦珠母贝3种群间的基因流动并不大。刘必谦等^[4]曾分析过牡蛎等贝类的基因流动现象, 认为贝类间存在基因流动现象, 但基因流动远不如人们想象的大。此观点与本文结论相符。合浦珠母贝与牡蛎同属营附着生物, 这是否就是限制贝类基因流动的主要因素还有待进一步验证。刘必谦等^[4]在对4个不同地区的大连湾牡蛎进行研究时发现, 相邻种群的遗传差异不明显, 且遗传差异与地理位置有关, 地理位置相距越远, 遗传差异越明显, 这与本文结果大体一致。从图1可看出, 海南三亚地处海南岛南端, 与深圳和广西种群相隔琼洲海峡, 而深圳种群与广西种群的合浦珠母贝幼贝则可沿着海湾迁移扩散^[4], 导致海南种群与深圳和广西种群间较远的亲缘关系。又因经过多年人工养殖, 基因交流越来越少, 3种群间遗传距离较大也是可理解的。如果能采集各地理种群的野生合浦珠母贝进行类比分析则更具说服力。宋林生^[6]对日本

对虾野生种群和养殖群体的遗传结构和遗传变异进行比较后认为,日本对虾野生种群无论是多态位点比例还是杂合度都明显高于其养殖群体,说明日本对虾野生资源处于较好状态,需对野生资源进行合理保护。王爱民^[7]对海南三亚、海南洋浦港和广西涠洲岛的野生合浦珠母贝及广东雷州的养殖合浦珠母贝进行了 RAPD 分析,认为野生群体的遗传多样性大于养殖群体的遗传多样性,提示在合浦珠母贝野生种群中极有可能存在养殖种群中丢失的优异及抗逆性强的基因。

参考文献:

- [1] 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1993.205-209.
- [2] 金启增,黎辉,何慧.珍珠生长激素在合浦珠母贝育珠中的作用[J].热带海洋,1998,17(4):44-49.
- [3] 金启增.珍珠贝种苗生物学[M].北京:海洋出版社,1992.1-5.
- [4] 刘必谦,戴继勋,喻子牛.RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用[J].青岛海洋大学学报,1998,28(1):82-88.
- [5] 宋林生,相建海,周岭华,等.六种海产虾类基因组 DNA 多态性的 RAPD 标记研究[J].海洋与湖沼,1999,30(1):62-67.
- [6] 宋林生,相建海,李晨曦,等.日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究[J].海洋与湖沼,1999,30(3):261-266.
- [7] 王爱民,邓凤蛟,张锡元,等.马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析[J].武汉大学学报(自然科学版),2000,46(4):467-470.
- [8] Apostol B L, Black IV W C, Reiter P, et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico[J]. Heredity, 1996, 76:325-334.
- [9] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7:478-484.

RAPD analysis of three cultured populations of *Pinctada martensii*

SU Tian-feng¹, CAI Yun-chuan², ZHANG Dian-chang³, JIANG Shi-gui¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Fisheries College, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

3. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Genetic polymorphisms of genomic DNA of three *Pinctada martensii* populations cultured in the farms of Beihai (Guangxi Province), Sanya Harbor (Hainan Province) and Shenzhen (Guangdong Province) were detected by RAPD technique using 40 random primers. The results show that 13 primers with 10 bp each are effective and each primer gives 1-11 fragments for each sample with the fragment length 100-2 000 bp. One hundred and forty DNA fragments are produced and 16 fragments are generated in the three populations of *Pinctada martensii*. The fragments numbers of the three populations are 58(Beihai), 91(Sanya) and 71(Shenzhen), respectively. The percentages of the polymorphic loci are 41.4%, 65.0% and 58.4%, respectively. The genetic distance demonstrates that the lineage of Sanya and Beihai populations is far, and that of Shenzhen and Beihai populations is close. The differences of fingerprintings obtained by primers S₁₁ and S₃₅₈ are so obviously that they can be used as molecular markers.

Key words: *Pinctada martensii*; cultured populations; RAPD; molecular marker; genetic diversity

Corresponding author: JIANG Shi-gui