

文章编号: 1004 - 7271(2006)02 - 0234 - 05

·研究简报·

温州乐清湾三个泥蚶群体遗传多样性的初步研究

徐义平¹, 孙开练², 杨桂梅³, 李琼文¹, 鲍宝龙^{3,4}, 任大明⁴

(1. 乐清市海洋与渔业局, 浙江 乐清 325600; 2. 温州市海美鲜集团公司, 浙江 温州 325600;
3. 上海水产大学生命学院, 上海 200090; 4. 复旦大学遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要:采用形态判别分析和 RAPD 分析相结合的方法,对温州乐清湾地区三个泥蚶群体:乐清湾泥蚶,福建泥蚶,和韩国泥蚶三个群体的遗传多样性进行了初步的分析。结果表明:(1)在分子水平上,乐清湾泥蚶群体与韩国群体的亲缘关系最为接近,而与地理位置更为接近的福建群体亲缘关系较远。(2)根据形态判别分析,乐清湾泥蚶群体与福建泥蚶群体亲缘最近,而与韩国较远。(3)韩国泥蚶群体的遗传多样性最高,乐清湾泥蚶群体次之,福建泥蚶群体最低。三者的平均遗传杂合度和群体内的遗传距离分别为 0.275 4 和 0.304 8, 0.257 5 和 0.240 1, 以及 0.247 3 和 0.211 5, 但总体来说,三者的遗传多样性都保持比较高的水平。(4)随机引物 S.418, S.359 和 S.431 扩增的结果有乐清湾泥蚶群体特有的条带,其可以作为区分乐清湾泥蚶与其它两种泥蚶的分子标记。

关键词:泥蚶;群体;形态判别分析;RAPD;亲缘关系;遗传多样性;乐清湾

中图分类号:S 917 文献标识码:A

Primary research on the genetic diversity of three populations of *Tegillarca granosa* in Yueqing Bay

XU Yi-ping¹, SUN Kai-lian², YANG Gui-mei³, LI Qiong-wen¹, BAO Bao-long^{3,4}, REN Da-ming⁴

(1. Bureau of Marine and Fisheries, Yueqing 325600, China;

2. Group of Haixianmei, Wenzhou 325600, China;

3. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

4. The State Key Laboratory of Genetic Engineering Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Here we used morphological discrimination analysis and RAPD analysis to study the phylogenetic relationship and genetic diversity of three populations of *Tegillarca granosa* in Yueqing Bay Wenzhou area. The results showed as follows: (1) The phylogenetic relationship of Yueqing population and Korea population is closer than that of Yueqing population and Fujian population on molecular level, although the geography relationship of Yueqing population and Fujian population is much closer. A possible explanation is that the gene pool of Yueqing population was contaminated by Korea population. (2) However, the phylogenetic relationships of three populations, which are based on morphology data, consisted with the geography relationships. It shows that the

收稿日期: 2005-10-08

基金项目: 温州市海洋与渔业局、乐清市海洋与渔业局、乐清市科技局课题资助; 上海市重点学科项目(Y1101)

作者简介: 徐义平(1966-), 男, 浙江乐清人, 高级工程师, 主要从事贝类育苗、养殖和水生生物资源保护, Tel: 0577-62529328, E-mail: yqxyp@sohu.com.

通讯作者: 鲍宝龙, Tel: 021-65710024, E-mail: bilbao@shfu.edu.cn

degree of contamination of Korea population is not enough to change evidently the shell outline of Yueqing population. (3) From highest to lowest, the genetic diversity of three populations is Korea, Yueqing, and Fujian. Their average heterozygosity is 0.275 4, 0.257 5 and 0.247 3, and the average genetic distance of each population is 0.304 8, 0.240 1 and 0.211 5, respectively. These also show that the genetic diversities of the three populations maintained high level. (4) There 4 specific bands appeared in Yueqing population using random primers S.418, S.359 and S.431 PCR amplification, and they could be used as molecular markers of Yueqing population.

Key words: *Tegillarca granosa*; population; morphological discrimination analysis; RAPD; phylogenesis; genetic diversity; Yueqing Bay

乐清湾是我国重要的泥蚶栖息地,自1993年泥蚶生产性人工育苗成功以后,泥蚶人工养殖在乐清湾地区迅速发展,乐清湾人工泥蚶的养殖产量占全国的60%以上。由于人工苗种培育所采用的亲蚶均来自人工养殖的泥蚶,乐清湾泥蚶养殖群体的遗传多样性可能会有一定的影响。此外,来自福建和韩国的外来泥蚶群体,由于人为因素纷纷被引入乐清湾地区进行暂养和养殖,可能对当地的泥蚶群体的遗传性状造成比较大的影响。为了乐清湾泥蚶人工养殖业的可持续发展,目前急需对人工养殖群体的遗传多样性状况进行调查。利用RAPD技术分析种群的遗传多样性有许多报道,在目前泥蚶基因组背景不清楚的情况下,利用RAPD技术分析遗传多样性往往成为首选的技术。李太武等^[1]对中国几个地区的泥蚶群体应用RAPD进行了分析,但没有包括乐清湾的泥蚶群体。本实验中,我们采用形态框架数据和RAPD分子数据相结合的方法,对目前温州乐清湾存在的三个主要泥蚶群体的遗传多样性和外来群体对乐清湾泥蚶群体的影响进行初步的调查,为今后温州乐清湾泥蚶种质资源的保护和人工养殖业的可持续发展提供决策依据。

1 材料与方法

1.1 采样和形态数据采集

实验所需样品分别取自温州乐清市场的来自韩国,福建的泥蚶,以及乐清西门岛非养殖场的乐清湾泥蚶。分别对三个群体各20个个体进行了泥蚶壳的最大直径长和8个形态框架数据的测量,具体参见图1。

1.2 基因组DNA的提取

每个群体取20个个体,分别剪取斧足组织100 mg,剪碎,加入1 mL裂解液(10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 0.1 mol/L EDTA pH 8.0, 0.5% SDS), 37 °C温育1 h;加入蛋白酶K至终浓度100 μg/mL, 50 °C过夜消化;加入等体积的饱和酚,温和颠倒使两相混合, 6 500 r/min离心15 min;将水相移至另一离心管,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),轻缓混均, 6 500 r/min离心15 min;取上层水相,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)轻缓混均, 6 500 r/min离心20 min。将水相移至另一离心管,加入0.2倍体积的10 mol/L乙酸铵,2倍体积的无水乙醇,混均, -20 °C沉淀30 min以上, 8 000 r/min离心5 min收集沉淀, 70%乙醇洗涤DNA沉淀2次,室温下,乙醇自然

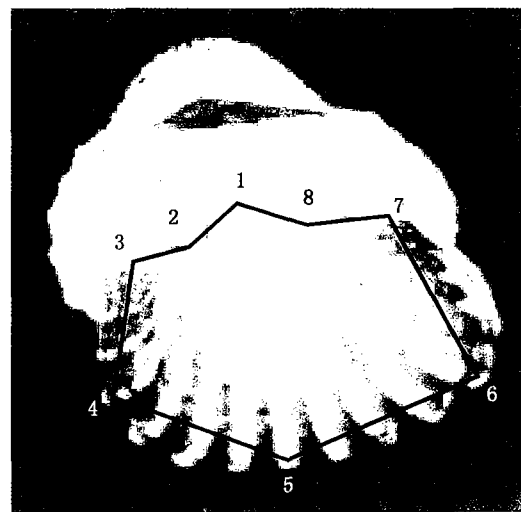


图1 泥蚶外部形态的框架结构示意图

Fig.1 Truss network of distance measures in *Tegillarca granosa*

8个定位点之间的距离为8个框架数据。例如D1-2表示定位点1与定位点2的直线距离。1.壳顶;2.一龄年轮左侧边缘;3.左侧棱角顶点;4.左侧第4条放射肋下侧端点;5.左侧第8条放射肋下侧端点;6.右侧第5条放射肋下侧端点;7.右侧棱角顶点;8.一龄年轮右侧边缘。

挥发,凉干。沉淀溶解于适量的 TE(100 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA pH 8.0)中。

1.3 RAPD

在 RAPD 反应中采用的随机引物是由上海生工生物公司合成的。RAPD 的反应体系为 25 μ L, 包括随机引物(6.25 μ mol/L)1 μ L, dNTPs(2.5 μ mol/L) 1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, Taq 酶 2.5 U, 泥蚶基因组 DNA 0.5 μ L。反应过程为 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 40 循环中:94 $^{\circ}$ C 45 s, 37 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 上海复日凝胶成像系统下观察, 拍照。

1.4 数据分析

为了去除不同大小的泥蚶对数据的影响, 对 8 项形态框架数据分别除去泥蚶壳的最大直径长。然后采用 SPSS 统计软件^[2]进行聚类分析。

RAPD 的电泳条带按照软件包 TFPGA^[3]格式记分, 在同一基因座位上, 1 表示有条带, 2 表示没有条带。根据 Nei^[4]的无偏差杂合率计算公式估算各个基因座位的平均遗传杂合度。基因座位多态率是根据 Lynch 和 Milligan^[5]的泰勒展开式估计的。F 统计量(Fst)估算的置信区间是通过 99% 置信水平和 1 000 个重复的自举法(bootstrapping)产生的。各个种群及种群内部各个体之间的遗传距离通过 Nei's^[4,6] 计算出来的, 然后利用 UPGMA^[7]构建群体之间的系统树。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 多态性和遗传差异

在本研究所使用的 20 个随机引物中, 我们采用了 18 个随机引物所产生的总共 152 个条带。其中随机引物 S. 418 能扩增 2 条乐清湾群体特有的条带, 随机引物 S. 359 能扩增出 1 条乐清湾群体的特有条带, S. 431 能分别扩增出 1 条乐清湾群体的特有条带, 这些特有条带可以用作鉴定乐清湾泥蚶的分子标记。图 2 显示的是其中的一张 RAPD 扩增的电泳图。所有 45 个条带都有多态性, 平均遗传杂合度 0.2601。各个群体的平均遗传杂合度和多态位点比例见表 1, 以平均遗传杂合度和多态位点比例作为遗传多样性的指标, 可见三个群体均具有较丰富的遗传多样性。本研究中得出的韩国和福建泥蚶群体的平均杂合度与李太武等^[1]的非常接近, 但多态位点比例要低一些。所有 45 个多态位点的 Fst 值为 0.419 2(99% CI, 0.300 2~0.543 2), 表明总的遗传变异有 41.92% 出现在群体之间, 而 58.08% 出现在群体内。较高的群体内的遗传多样性说明有较稳定的群体结构。

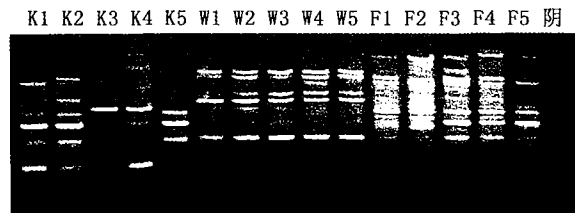


图 2 3 个泥蚶群体基因组 DNA 的 RAPD 扩增结果的电泳图

Fig. 2 A represent RAPD gel of three populations of *Tegillarca granosa*
K. 韩国群体; W. 乐清湾群体; F. 福建群体。

表 1 3 个泥蚶群体的多态位点百分率及平均遗传杂合度
Tab. 1 Average heterozygosity and percentage polymorphic loci for three populations of *Tegillarca granosa* across 45 RAPD loci

群体	个体数	平均遗传杂合度	多态位点比例(%)
福建群体	20	0.247 3	62.222 2
韩国群体	20	0.275 4	66.666 7
乐清湾群体	20	0.257 5	55.555 6

进一步用遗传相似值及遗传距离分析各群体之间以及各群体内的遗传分化程度, 结果见表 2。3 个群体两两之间的遗传距离在 0.183 0~0.481 9 之间, 遗传相似度在 0.617 6~0.832 8 之间, 乐清湾群体与韩国群体之间的遗传距离最小, 遗传相似度最大, 表明两者最为接近, 而与福建群体相对较远。此结果表明乐清湾泥蚶群体的遗传性状可能受到韩国泥蚶的污染, 温州早在 1996 年就开始引进韩国泥蚶,

引进的泥蚶先在滩涂或围塘暂养一段时间,然后送到市场去销售。暂养的泥蚶部分会遗留在蚶塘中,与当地的乐清湾泥蚶杂交,可能造成目前的这种情况。由于本研究中所采集的是泥蚶小样本数据,今后需要扩大样本数,进行更为细致的调查。

表2 3个泥蚶群体的遗传距离及遗传相似度
Tab.2 Genetic distance and genetic similarity value among three populations of *Tegillarca granosa* based on Nei's (1972,1978) unbiased identity measures

	遗传距离	遗传相似度
福建群体/韩国群体	0.263 4	0.768 4
韩国群体/乐清湾群体	0.183 0	0.832 8
乐清湾群体/福建群体	0.481 9	0.617 6
福建群体的个体之间	0.211 5	0.810 3
韩国群体的个体之间	0.304 8	0.736 9
乐清湾群体的个体之间	0.240 1	0.790 4

对三个群体内部的比较,福建群体内个体之间的遗传距离最小,遗传相似值最大,标明福建群体内的遗传多样性最低,乐清湾群体次之,韩国最高。通过对三个群体所有个体的聚类分析,各个群体的个体都聚集在各自的群体内(图3),表明群体内的遗传差异并没有超过群体间的遗传差异程度。乐清湾泥蚶群体目前仍保留如此高的遗传多样性,这与泥蚶人工育苗每年采用不同的亲蚶有密切关系。当前的乐清湾泥蚶的养殖过程中,也没有出现近年来其它养殖品种经常出现的抗病力或其他养殖性能下降的报道^[8]。

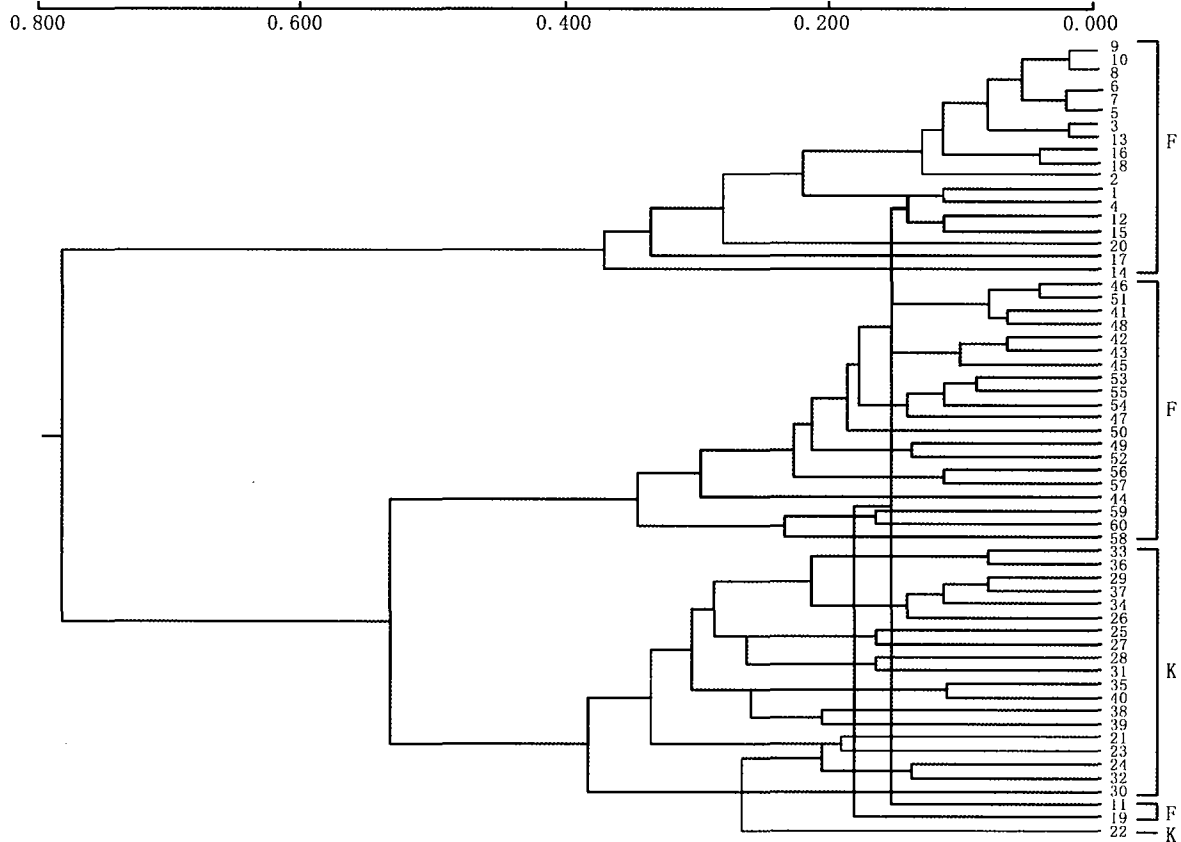


图3 基于泥蚶个体的遗传距离聚类图

Fig.3 Individual-wise dendrogram revealed by UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) cluster analysis using Nei's (1972,1978) genetic distance

K. 韩国群体;W. 乐清湾群体;F. 福建群体。

2.2 形态距离

为了从表形性状水平观察韩国泥蚶群体对乐清湾泥蚶群体的影响,我们采用了 8 个能反映泥蚶外形差别的框架形态数据(见图 1),并剔除了不同大小的泥蚶在形态差别上的影响。利用聚类分析方法,发现乐清湾泥蚶的外形特征与福建泥蚶最为相近,而与韩国泥蚶相对较远(见图 4)。这表明在分子水平上初步表现出来的乐清湾泥蚶受韩国泥蚶种质污染的现象,还不足以改变目前乐清湾泥蚶群体的外形特征。

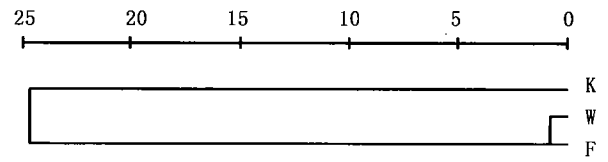


图 4 三个泥蚶群体的形态聚类分析图

Fig. 4 Clustering dendrogram of three populations in morphology

K. 韩国群体; W. 乐清湾群体; F. 福建群体。

参考文献:

- [1] Li T W, Li C H, Song L S. Rapid variation within and among five populations of *Tegillarca granosa*[J]. Biodiversity Science, 2003, 11(2):118 - 124.
- [2] Norusis M J. SPSS for Windows. Base System User's Guide. Release 6.0. SPSS[M]. Chicago, 1993.
- [3] Miller M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA), Version 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population Genetic Data[M]. Department of Biological Science, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ. 1997.
- [4] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[C]. Genetics 89, 1978. 583 - 590.
- [5] Lynch M, Milligan B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers[J]. Mol Ecol, 1994, 3:91 - 99.
- [6] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Am Nat, 1972, 106: 283 - 292.
- [7] Sokal R R, Michener C D. A statistical method for evaluating systematic relationships[C]. University of Kansas scientific Bulletin 28, 1958. 1409 - 1438.
- [8] Blake S G. Mitochondrial DNA variation in the cultured bay scallop[J]. Argopecten Irradians Journal of Shellfish Research, 1994, 13(1):301 - 302.