

研究简报

大珠母贝 3 个养殖种群的遗传多样性初步分析

石耀华¹ 桂建芳² 王 嫣¹ 王爱民¹ 曲艳波¹

(1. 海南大学海洋学院, 热带生物资源教育部重点实验室, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海口 570228;
2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态和生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

STUDIES ON THE GENETIC DIVERSITY OF THREE CULTURED POPULATIONS OF PINCTADA MAXIMA

SHI Yao-Hua¹, GUI Jian-Fang², WANG Yan¹, WANG Ai-Min¹ and QU Yan-Bo¹

(1. Key Laboratory of Tropic Biological Resources, Minister of Education, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiology Technology, Ocean College, Hainan University, Haikou 570228;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 大珠母贝; 遗传多样性; 养殖种群

Key words: *Pinctada maxima*; Genetic diversity; Cultured populations

中图分类号: S968 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)01-0131-04

大珠母贝 (*Pinctada maxima* Jameson), 俗称白蝶贝, 是最大的一种养殖海水珍珠的贝类, 最大个体壳高达 30cm 以上, 体重大于 5kg^[1], 是生产大型海水优质珍珠最理想的珠母贝。根据贝壳内表面外周珍珠质颜色的差异, 可以分为金唇 (Gold-lip, G) 贝、银唇 (Silver-lip, S) 贝和黄唇 (Yellow-lip, Y) 贝等。大珠母贝培育的珍珠因具有珠大、珍珠质层厚和珍珠光泽丰富等优点而备受青睐, 价值大大高于马氏珠母贝培育的“南珠”。我国在大珠母贝育苗、养殖和插核育珠的研究虽然有了许多有益的研究^[2-4], 澳大利亚和印度尼西亚的大珠母贝养殖较发达, 形成了金唇贝、银唇贝和黄唇贝等不同养殖种群。

随机扩增 DNA 多态性 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 虽然存在一些缺点, 但是自问世以来, 已被广泛地应用于陆生动物研究。近几年来, 该技术被用于从核酸分子水平上对鱼、虾、贝等主要水生动物的亲缘关系及其演化过程的研究, 但是主要研究对象是鱼类^[5-7], 对其他海洋动物尤其是珍珠贝的研究较少。本文采用 RAPD 技术对印度尼西亚大珠母贝不同养殖种群的遗传多样性和遗传距离进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 澳大利亚 Atlas Pacific Limited Company 在印度尼

西亚经过多代选育的养殖群体。金唇 (G) 贝、银唇 (S) 贝和黄唇 (Y) 贝三个种群取材样本数分别为 49、50 和 50 个。取新鲜的大珠母贝闭壳肌, 70% 乙醇固定 2h, 换用 95% 的乙醇, 2—4h 后再换一次 95% 乙醇, 于 -20℃ 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 每个样品称取 0.2g 闭壳肌, 0.8% 生理盐水漂洗, 剪成细末, 置于 1.5mL 离心管中, 加入 0.5mL STE (10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH 8.0), 100mmol/L NaCl), 65μL 10% 的 SDS 和 6μL 蛋白酶 K (10mg/mL), 颠倒混匀, 55℃ 保温消化 4—6h, 消化过程中每 30min 颠倒混匀一次。待肌肉消化完全后依次以等体积酚/氯仿/ (酚 氯仿 异戊醇 = 25:24:1) 和氯仿/异戊醇 (氯仿 异戊醇 = 24:1) 各抽提 2 次, 然后加入 2 倍体积的无水乙醇室温沉淀 DNA 30min 以上, 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, DNA 沉淀于室温干燥 15min 后溶于 250μL 灭菌双蒸水, 取 1μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 DNA 的质量和估计浓度, 其余 DNA 置 -20℃ 储藏备用。

1.2.2 RAPD 扩增 PCR 主要参照 Williams 等^[8], 对各参数适当调整优化。扩增反应总体积 15—25μL。其中包括 1× 扩增缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50mmol/L KCl, 0.001% 明胶), 200μmol/L 的 dNTPs, RAPD 引物 0.2μmol/L, MgCl₂

收稿日期: 2005-05-26; 修订日期: 2006-08-12

基金项目: 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题 (200FB092004); 海南省自然科学基金 (批准号: 804122) 资助

作者简介: 石耀华 (1970—) 男, 湖北咸宁人; 副教授; 从事水产生物遗传育种、发育和养殖研究。Tel: 0898-66261349, E-mail: stone70@sina.com

通讯作者: 王爱民, Tel: 0898-66187928, E-mail: aimwang6@hotmail.com

2.0mmol/L, 1U Taq DNA 聚合酶, 15—20ng 基因组 DNA。扩增参数为: 94 预变性 4min; 94 30Sec, 36 30 Sec, 72 1min 30 Sec, 45 个循环; 72 延伸 5min。

1.2.3 电泳观察 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 (1 × TBE, 3V/cm 恒压), EB 染色, 凝胶成像系统观察和拍照。

1.2.4 数据分析 统计各个样品的扩增带, 转换为 0 (无带)、1 (有带) 数据, 将 (0, 1) 矩阵数据输入计算机用 PopGen (1.32 版) 生物软件进行处理。将 RAPD 标记作为等位基因, 计算各种群的多态位点比例 P、种群内的遗传多样性值和种群间的遗传距离等。P = 多态性扩增片段数 / 扩增片段总数; 种群内的遗传多样性值 $D = 1 - S_{xy}$, 遗传一致度指数 $S_{xy} = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$, 相对遗传距离 $D_{xy} = - \ln (S_{xy} / S_x \cdot S_y)$, 其中 N_{xy} 是个体 x 和个体 y 共有位点数, N_x 和 N_y 分别是个体 x 和个体 y 共扩增出位点数。群体内的相似性指数为此群体内

所有个体间相似性指数的平均值, 群体间的相似性指数为两群体任意两个体的相似性指数的平均数。 S_{xy} 为两群体间的相似性指数, S_x, S_y 分别表示群体 X 和群体 Y 的相似性指数^[9, 10]。Shannon 信息指数 (Shannon's Information index) 按照公式 $H = - \sum i \ln i / N$ 计算, 其中, i 为某一条带在群体中出现的频率, \ln 为自然对数, N 为群体总的位点数^[11]。

2 结果

2.1 引物筛选和 RAPD 图谱分析

订购自于大不列颠哥伦比亚大学 (the University of British Columbia) 的 RAPD set # 1 的 100 条引物和购自博亚生物技术有限公司 (上海) 的编号为 BA0001-BA0200 的 200 条 RAPD 引物进行了筛选, 获得了 16 条在各个群体中都能够扩增出清晰带纹的随机引物 (表 1)。

表 1 RAPD 扩增的随机引物序列
Tab. 1 Sequences of RAPD Primer

博亚引物编号 No. of Bioasia primer	引物序列 (5' 3') Sequences of primer	NAPS 引物编号 No. of NAPS primer	引物序列 (5' 3') Sequences of primer
BA0029	GGG TAA CGC C	08	CCT GGC GGT A
BA0033	CAG CAC CCA C	11	CCC CCC TTT A
BA0045	TGA GCG GAC A	90	GGG GGT TAG G
BA0093	CTC TCC GCC A	91	GGG TGG TTG C
BA0097	ACG ACC GAC A	92	CCT GGG CTT T
BA0105	AGT CGT CCC C	96	GCC GCC ATG G
BA0108	GAA ACA CCC C		
BA0156	GGT GAC TGT G		
BA0158	GGA CTG CAG A		
BA0197	TGG GGA CCA C		

16 条引物在各个体中扩增的片段数在 2—12 条之间, 片段大小位于 0.2—3.5kb, 主要集中于 0.5—2.0kb (图 1 显示)。个体之间和群体之间的扩增都存在差异, 没有两个个体的扩增结果完全相同, 反映了各个体间基因组成存在一定的差别, 同时显示 RAPD 具有较高的分辨率。3 个大珠母贝种群共检测到 90 个位点, 其中, 多态性位点数分别为 G 68 个, S 65 个, Y 72 个, 多态位点比例 P 由大到小顺序依次为: $P_Y > P_G > P_S$; 对三个种群总体而言, 90 个位点仅有 5 个完全

相同, 位点多态性为 94.4% (表 2)。

2.2 遗传分析

三个大珠母贝种群内的基因多样性指数和 Shannon 信息指数见表 2。结果显示, 无论是基因多样性指数还是 Shannon 信息指数, G 种群的值都要高于其余 2 个种群; S 和 Y 种群由于计算方法不同结果存在差异, S 种群的基因多样性指数高于 Y 种群, 但是其 Shannon 信息指数低于 Y 种群。

表 2 大珠母贝 3 个种群的多态位点比例、Nei 基因多样性和 Shannon 信息指数

Tab. 2 The ratios of polymorphic loci, Nei's^[10] gene diversity and Shannon's information index in each of 3 populations of *Pinctada maxima*

种群名称 Populations	样本数 Sample size	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比例 P (%) Ratios of polymorphic loci	Nei 基因多样性 Nei's gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon's information index
G	49	68	75.56	0.2904	0.4257
S	50	65	72.22	0.2891	0.4224
Y	50	72	80.00	0.2846	0.4242
G+S+Y	149	85	94.44	0.3386	0.5025

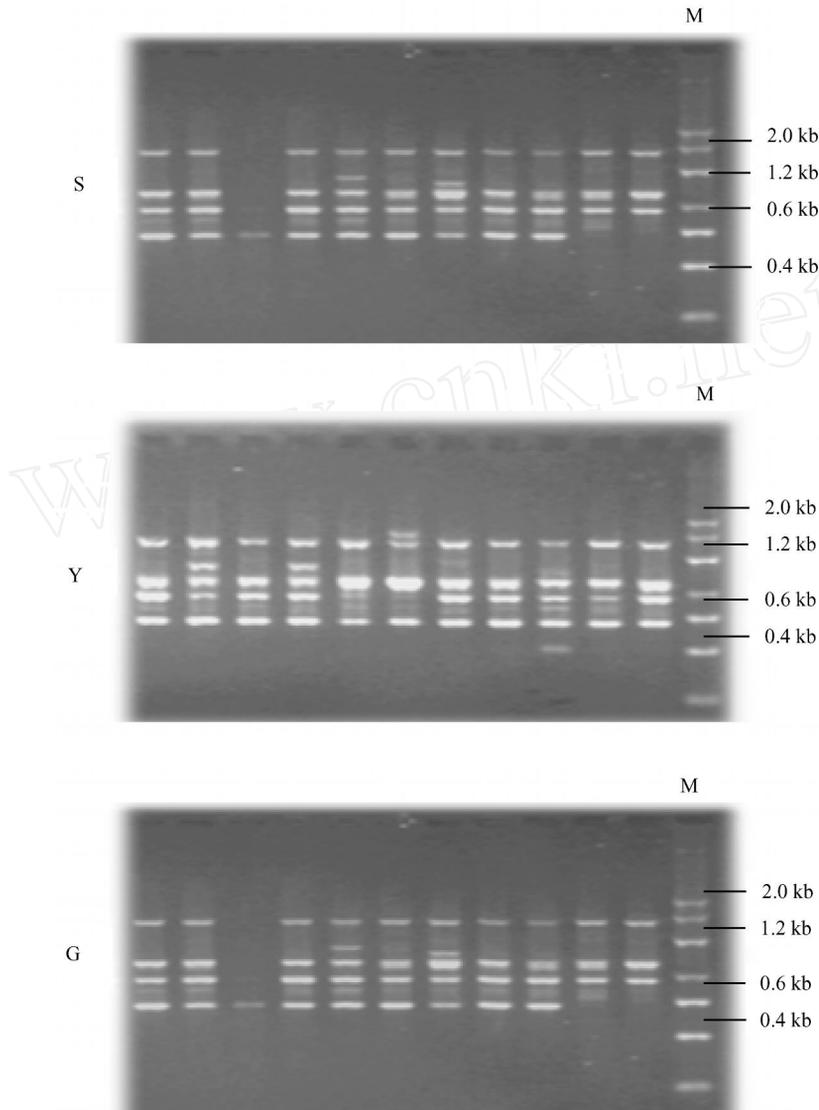


图 1 NAPS 90 号 RAPD 引物扩增 3 个大珠母贝种群的琼脂糖凝胶电泳图(M-DNA 分子标记,SD005 DNA Marker)

Fig. 1 Electrophoresis Map of RAPD Products amplified from 3 populations of *Pinctada maxima* DNA with NASP 90 primer (M-DNA Marker, SD005 DNA Marker)

种群间的遗传分析(表 3)结果表明,三个种群两两间的遗传一致度程度均较高,最低的是 Y 种群和 S 种群间的遗传一致度,为 0.8757,最高的是 G 种群和 Y 种群间的遗传一致度,为 0.9283。S 种群同 G 和 Y 种群间的遗传距离较大,分别为 0.1315 和 0.1328,几乎相同;G 和 Y 种群间的遗传距离较小,为 0.0744。

表 3 大珠母贝 3 个种群间的遗传一致度和遗传距离

Tab. 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between 3 populations of *Pinctada maxima*

种群名称 (Populations)	G	S	Y
G	****	0.8768	0.9283
S	0.1315	****	0.8757
Y	0.0744	0.1328	****

注:对角线以上为种群间遗传一致度,对角线以下为种群间遗传距离。

3 讨论

3.1 大珠母贝种群内的遗传多样性比较

大珠母贝三个养殖种群的多态位点比例都很高,其范围在 72.22%—80.00%之间,其中黄唇贝 Y 最高,暗示绝大多数 RAPD 位点在各个种群内都还没有完全纯合。此外,无论是 Nei 基因多样性还是 Shannon 信息指数,各养殖群体的值都较高,分别处于 0.2846—0.2904 和 0.4224—0.4257 范围之间,也表明种群内个体间具有较大的遗传差异,遗传多样性程度比较高。马氏珠母贝的研究表明^[12, 13],马氏珠母贝野生种群内的遗传多样性较高,Nei 基因多样性值在 0.312—0.4134 间,而养殖群体内个体差异较小,Nei 基因多样性值仅有 0.284,与本研究结果相似。大珠母贝养殖群体遗传多样性与马氏珠母贝养殖群体相似,可能暗示大珠母贝的野生种群和养殖种群的遗传多样性特征与马氏珠母贝相似:野生种

群的遗传多样性原本较高,但是由于人工繁殖,亲本数量的局限、非随机交配和多代选育,导致了遗传多样性降低。对大珠母贝野生种群的研究有助于进一步阐明其同养殖种群的遗传多样性关系。

尽管金唇贝 G 的位点多样性比例较黄唇贝 Y 低,但是, G 的 Nei 基因多样性和 Shannon 信息指数均较其余 2 个种群高,原因可能在于 G 群体在较多个体中得以体现的多态位点比例比 S 种群和 Y 种群高。S 种群的 Nei 基因多样性值较 Y 种群高,然而, S 种群的 Shannon 信息指数却比 Y 种群低,这种同一原始数据通过不同的计算方法得出的结果的不一致性,一方面表明 S 种群和 Y 种群的种群内遗传多样性程度需要更多的分子标记方法和数据分析处理方法才能够比较与确定,另一方面,暗示数据的生物统计分析理论和方法有待于进一步完善。

3.2 大珠母贝种群间的遗传一致度和遗传距离比较

3 个大珠母贝种群两两间的遗传一致度都很高,大于 0.8757,表明它们间的亲缘关系很近,在大珠母贝的分子进化过程中的分化发生较晚。形态学性状上,3 个种群除了在贝壳内表面唇的色泽存在差异外,其余性状很难彼此区分,即形态学性状的一致性很高,这与本文在核酸分子水平上的研究结果一致。

在色泽上,金色唇和黄色唇更接近,而银色唇与二者的差异则要明显得多。G 种群和 Y 种群间的遗传距离最低;G 种群和 Y 种群各自与 S 种群间的遗传距离相对较大,而且这种遗传距离差异大约相同,分别为 0.1315 和 0.1328,暗示 G 种群和 Y 种群间的亲缘关系更密切。

参考文献:

- [1] Wang R C, Wang Z P, Zhang J Z. The Culture Biology of Sea Shellfish [M]. Qindao: Qiandao Ocean University Press. 1993, 208—209 [王如才,王昭萍,张建中. 海水贝类养殖学. 青岛:青岛海洋大学出版社. 1993, 208—209]
- [2] Luo Z H, Cao J L, Qi C Y, *et al.* Study on post-operation treatment for *Pinctada maxima* (Jameson) [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 1997, 17(1): 1—4 [罗振鸿,曹家录,齐常元,等. 大珠母贝术后处理研究. 湛江海洋大学学报, 1997, 17(1): 1—4]
- [3] Yu D H, Wang Y P, Wu K C, *et al.* Parameters of electroporation in transgene of *Pinctada maxima* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(5): 408—412 [喻达辉,汪亚平,吴开畅,等. 大珠母贝基因转移的电击参数. 水产学报, 2001, 25(5): 408—412]
- [4] Lao Z, Ou C X, Liang S, *et al.* Studies on the rearing of artificially inseminated juvenile pearl oyster, *Pinctada maxima* Jameson [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2003, 23(4): 20—24 [劳赞,欧春晓,梁盛,等. 大珠母贝人工苗育成研究. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(4): 20—24]
- [5] Bardacki F, Skibinski D O. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia (Pisces: Cichlidae) [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(1): 78—79
- [6] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch based on detection of molecular markers by RAPD techniques [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2000a, 88: 133—139
- [7] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays [J]. *J Mol Evol*, 2000b, 51: 498—506
- [8] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531—653
- [9] Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 1972, 106: 283—292
- [10] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 3321—3323
- [11] Wachia F N, Waugh R, Hackett C, *et al.* Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers [J]. *Genome*, 1995, 38(2): 201—210
- [12] Wang A M, Deng F J, Zhang X Y, *et al.* RAPD analysis on genetic diversity of *Pinctada martensii* (Dunker) [J]. *Journal of Wuhan University*, 2000, 46(4): 467—470 [王爱民,邓凤娇,张锡元,等. 马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析. 武汉大学学报, 2000, 46(4): 467—470]
- [13] Wang A M, Yan B, Ye L, *et al.* Genetic diversity analysis of three wild populations of *Pinctada martensii* (Dunker) using RAPD technique [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(2): 163—168 [王爱民,阎冰,叶力,等. 三个野生种群马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 研究. 农业生物技术学报, 2003, 11(2): 163—168]