

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)四个地理群体遗传结构的 RAPD 分析

梁超^{1,2}, 杨爱国¹, 刘志鸿¹, 周丽青¹, 吴彪¹

(¹ 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; ²

上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 200090)

摘要: 应用 RAPD 标记技术对魁蚶(*Scapharca broughtonii*) 一个韩国群体与三个中国群体的遗传多样性进行 RAPD 分析。对四个群体 133 个个体进行扩增, 共检测到 171 个位点, 其中多态性位点为 167 个, 四个群体的多态性位点比例: 韩国群体为 86.55%、黄岛群体为 90.06%、蓬莱群体为 85.96%、前三岛群体为 89.47%; 四个群体 Shannon's 多样性指数为 $0.4599 \pm 0.2323 \sim 0.4913 \pm 0.2136$, Nei's 多样性指数为 $0.3083 \pm 0.1707 \sim 0.3310 \pm 0.1992$, 表明四个群体遗传多态性较高; 四个群体遗传分化指数在 0.0058 ~ 0.1214 之间, 其中韩国与中国的三个群体分化明显, 说明韩国与中国三个群体的遗传结构差异较大, 黄岛群体与前三岛群体间的遗传分化最小。基于四个群体 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类分析显示, 黄岛群体与前三岛群体最先聚类, 两群体间距离最短, 再与蓬莱群体聚类, 最后与韩国群体聚类。这些数据可为魁蚶的种质资源的合理开发和保护及遗传改良提供科学依据。

关键词: 魁蚶; 遗传多样性; RAPD;

RAPD Analysis of genetic variations in four geographical populations of *Scapharea broughtonii*

LIANG Chao^{1,2} YANG Ai-guo¹ LIU Zhi-hong¹ ZHOU Li-qing¹ WU Biao¹

(¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 200090)

ABSTRACT RAPD technology was used to analyze the genetic variations and genetic structure in four geographical populations of *Scapharea broughtonii* from Korea and China. 171 loci were detected in the four populations through 25 random primers, and 167 of these loci were polymorphic. The results indicated that the genetic diversity of the four populations was rich. The Shannon's index ranged from 0.460 ± 0.232 to 0.491 ± 0.214 , and the Nei's genetic diversity index ranged from 0.308 ± 0.171 to 0.331 ± 0.199 . G_{st} values showed that there are significant genetic differentiation between Korean population and the three Chinese populations. The UPGMA dendrogram of four *S. broughtonii* populations based on Nei's (1972) genetic distance showed that Huangdao and Qiansandao populations clustered first, then clustered with the Penglai

population, before further clustered with the Korean population. The UPGMA dendrogram gave a clear division between the Korean and Chinese populations. The information of the genetic variation and differentiation among four *S. broughtonii* geographical populations can be useful for conservation of *S. broughtonii* stocks and future genetic improvement by selective breeding.

KEY WORDS *Scapharca broughtonii* Genetic diversity RAPD

魁蚶 (*Scapharca broughtonii* Schrenck) 隶属软体动物门 (Mollusca), 瓣鳃纲 (Lamellibnchia), 列齿目 (taxodonta), 蚶科 (Arcidae), 俗称赤贝、血贝、大毛蛤, 是一种大型冷温性蚶类, 广泛分布于太平洋西部沿岸, 日本北海道以南, 朝鲜、菲律宾、俄罗斯东南部。在我国主要分布辽东半岛东南部, 山东半岛北部和东部等海区。分布区从近岸水深 3m 到外海近 60m 处, 喜泥质或泥沙质海底 (刘世禄, 2005)。魁蚶成体个大体肥, 肉质鲜美, 经济价值很高, 近年来由于市场和出口大量需求, 自然资源远远不能满足市场需求, 人工养殖得到大力发展, 在魁蚶养殖生产实践中, 中国魁蚶在生长速度、成活率等生物学指标方面与韩国魁蚶有一定的差异, 养殖单位比较认可韩国的魁蚶苗种, 使许多苗种生产单位每年从韩国引进魁蚶种贝进行苗种生产。

对中国与韩国的魁蚶种群进行遗传多样性分析, 了解这两地理区域种群的遗传背景和遗传差异状况, 以及这种遗传上的差异是否是这两个异域种群在生长速度成活率等生物学指标表现出差异的原因, 对魁蚶的种质资源的合理开发和保护及遗传改良都具有重要理论和现实意义。

近年来, RAPD 技术已广泛应用于水产动物的遗传背景研究, Carcia (1995) 等用 RAPD 技术研究了斑节对虾 *Penaeus monodon* 的遗传变异, 并讨论了此技术在对虾选育育种中的应用前景; 常亚青 (2004) 等用 RAPD 技术对 5 种经济海胆基因组 DNA 多态性进行了研究; Patwary (1994) 等采用 RAPD 技术研究了扇贝 (*Placopecten magellanicus*) 的遗传结构; 沈怀舜 (2003) 等用 RAPD 技术对我国沿海三个文蛤 (*Meretrix meretrix*) 的地理种群进行了遗传差异分析, 找到了区分三个种群的遗传标记。高悦勉 (2007) 等对虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 三种扇贝进行遗传结构的 RAPD 分析。刘萍 (2007) 等利用 RAPD 技术进行了中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆, 王庆恒 (2006) 等利用 RAPD 技术分析了光裸星虫遗传多样性。有关于魁蚶不同地理种群遗传多样性方面的研究较少, 喻子牛 (1997, 1998) 等采用淀粉凝胶电泳技术研究了青岛近海魁蚶群体的等位基因酶遗传变异和对秦皇岛、大连、青岛、韩国釜山 4 个魁蚶群体样本的等位基因酶遗传变异。Eun-Seob Cho (2007) 用 COI 序列对韩国、俄国、中国的魁蚶群体进行了遗传结构研究。针对在养殖过程中, 中国魁蚶与韩国魁蚶群体表现出来的差异, 本实验采用 RAPD 技术对中国和韩国魁蚶地理种群进行了遗传多样性、遗传变异等研究, 分析群体之间的差异大小以及能否利用这种差异进行遗传改良。以期今后魁蚶种质资源保护和遗传育种提供遗传学资

料。

1 材料与方法

1.1 材料

四个群体的魁蚶于 2007 年 8 月至 10 月分别随机采自于山东蓬莱 (SP)、山东黄岛 (SHD)、江苏前三岛 (JQ)、韩国统营 (Korea) 四个海区, 均为自然群体, 样本数量分别为,31、38、36、28。

1.2 基因组 DNA 提取

将魁蚶解剖, 取 100mg 左右的外套膜肌肉加入 1.5mLEffendorf 管中, 加入 475 μ L 抽提缓冲液 (Tris-HCl 10mM, PH8.0; EDTA 10mM, pH 8.0) 剪碎后 加入 25 μ LSDS(10%) 和 5 μ L 蛋白酶 K(20mg/L), 55 $^{\circ}$ C 水浴消化 3-4h, 消化液用等体积的酚抽提 10min, 离心 10min (12000r/min), 取上清, 用等体积氯仿:酚(1:1)抽提两次, 离心 10min (12000r/min), 取上清, 用等体积氯仿抽提 10min, 离心 10min (12000r/min), 取上清加入 1/25 上清体积的 NaCl (5M) 溶液和 2 倍体积的冰无水乙醇, 出现絮状沉淀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30min, 12000r/min 离心 10min, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2-3 次后, 常温下晾干, 加入 50 μ L TE(Tris-HCl 10mM, pH 8.0; EDTA 0.1mM, pH 8.0) 溶解成母液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。对母液用核酸定量仪结合 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 浓度和质量检测。

1.2 RAPD 反应

RAPD 扩增反应总体积为 25 μ L, 包括 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L; dNTPs(2.5mM)2 μ L MgCl₂(25mM)1.5 μ L; Taq 酶(5U/ μ L)0.3 μ L; 随机引物(5 μ M)2 μ L; 基因组DNA2 μ L(50ng/ μ L), 用超纯水将反应体系补足到 25 μ L。反应体系在EPPENDORF Mastercycler gradient 5331PCR仪器上进行扩增, 经 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min后, 进行 45 个扩增循环, 每一个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 37 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min。最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB染色, UVP凝胶成像系统下观察记录。

1.3 数据统计分析

记录下电泳后清晰的扩增条带, 每一个个体的扩增条带按有或无记录。出现扩增条带记录为 1, 无扩增条带记录为 0, 每一条片段作为一个基因位点进行分析。应用 POPGENE VERSION1.31 软件对四个群体的遗传学参数进行分析:

多态位点比例 $P = \text{多态扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$;

Shannon多样性信息指数 $I = -\sum P_i \ln P_i$, P_i 为位点 i 在某一群体中出现的频率 (Chalmers K J et al, 1992);

遗传分化指数 $G_{st} = (H_T - H_S) / H_T$, H_S 是各群体内遗传多态性平均值指数, H_T 是总群体的遗传多态

性指数(Nei 1973)；

群体间的相似性指数 $I = J_{XY}/(J_X J_Y)$ ， J_X 是群体X群体内所有位点基因一致性的算术平均值， J_Y 是群体Y内所有位点基因一致性的算术平均值，群体间的遗传距离是 $D = -\ln I(\text{Nei})$ ；

根据遗传距离值，采用 UPGMA 方法对群体进行聚类分析。

表 1 随机引物及其序列

Table 1 Primers used and their sequences

引物 Primer	碱基序列 (5'-3') Sequence(5'-3')	引物 Primers	碱基序列 (5'-3') Sequence(5'-3')
S204	CACAGAGGGA	S242	CTGAGGTCTC
S206	CAAGGGCAGA	S243	CTATGCCGAC
S207	GGCAGGCTGT	S301	CTGGGCACGA
S217	CCAACGTCGT	S303	TGGCGCAGTG
S218	GATGCCAGAC	S305	CCTTTCCCTC
S222	AGTCACTCCC	S306	ACGCCAGAGG
S223	CTCCCTGCAA	S308	CAGGGGTAGA
S228	GGACGGCGTT	S309	GGTCTGGTTG
S230	GGACCTGCTG	S311	GGAGCCTCAG
S233	ACCCCTGAA	S317	GACACGGACC
S234	AGATCCCGCC	S318	GACTAGGTGG
S236	ACACCCACA	S319	TGGCAAGGCA
S240	CAGCATGGTC		

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

实验从 80 个随机引物中筛选出扩增带清晰、重复性好的 25 个引物，其引物序列与名称见表 1。四个魁蚶群体共产生 171 个条带（例如图 1），片段大小在 100-3000bp 之间，其中多态性条带为 167 条，多态位点占所有扩增位点的 97.66%。分别统计魁蚶四个地理种群扩增结果，其多态位点比例大小顺序为黄岛群体 > 前三岛群体 > 韩国群体 > 蓬莱群体（表 2）。

表 2 魁蚶四个群体多态位点数目与多态位点比例

Table 2 Number of polymorphic loci and percentage of polymorphic loci in four populations of *S.*

broughtonii

	多态位点数 The number of polymorphic loci	多态位点比例 The percentage of polymorphic loci
Korea	148	86.55%
SHD	154	90.06%
SP	147	85.96%
JQ	153	89.47%
总计	167	97.66%

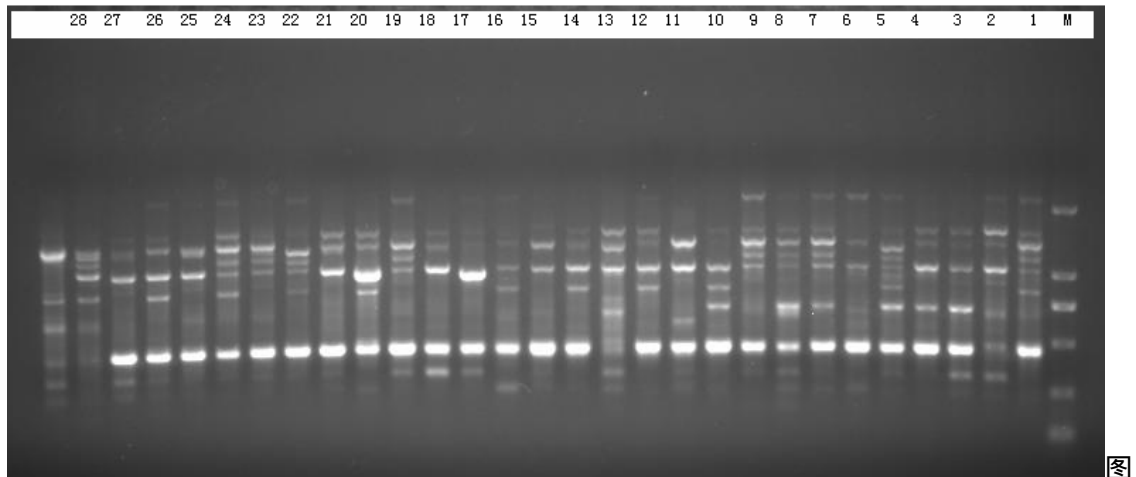


图 2 引物 S305 在韩国群体中扩增结果

Fig. 2 The band amplified fragment by S305 in Korean population of *S. broughtonii*

2.2 群体遗传多样性和遗传分化

四个群体中，Shannon's 多样性指数与 Nei's 的多态性指数都显示蓬莱群体的最低分别为 0.460、0.308，黄岛群体最高为 0.491、0.331（表 3）。

中国群体和韩国群体总群体遗传多态性指数 H_T 为 0.361，各群体内遗传多态性平均值指数 H_S 为 0.323，群体发生的遗传变异有 90.2%存在于群体内，9.8%存在于群体间。

魁蚶四个群体遗传分化指数为 0.006 ~ 0.121，其中韩国群体与黄岛、蓬莱、前三岛三个群体之间的遗传分化指数分别为 0.106、0.121、0.107，而黄岛、蓬莱、前三岛三个群体之间的分化指数在 0.006 ~ 0.053，说明韩国群体与这三个群体之间发生较大遗传分化，而中国三个群体之间遗传分化不大，其中黄岛与前三岛两个群体之间的分化指数最小，为 0.006（表 4）。

表 3 魁蚶四个群体之间的 Shannon's 多样性信息指数和 Nei's 基因多态性数值

Table 3 Shannon's information index and the Nei's gene diversity in the four populations of *S. broughtonii*

	Shannon's多态性指数 Shannon's Information index	标准差 St. Dev	Nei's 基因多态性数值 Nei's gene diversity	标准差 St. Dev
Korea	0.4622	0.2319	0.3102	0.1688
SHD	0.4913	0.2136	0.3310	0.1992
SP	0.4599	0.2323	0.3083	0.1707
JQ	0.4832	0.2168	0.3247	0.1617

表 4 魁蚶四个群体之间的遗传分化指数 G_{st}

Table 4 G_{st} values of pairwise comparison among the four *S. broughtonii* populations

Population ID	Korea	SHD	SP	JQ
Korea	0.0000			
SHD	0.1056 ^a	0.0000		
SP	0.1214 ^a	0.0513 ^b	0.0000	
JQ	0.1065 ^a	0.0058 ^c	0.0531 ^b	0.0000

注：数字上标有相同字母的表示差异显著，标有不同字母的表示差异不显著 ($\alpha=0.05$)

Note: No significant difference between those containing same letters, significant difference between those containing different letters ($\alpha=0.05$)

2.3 群体遗传距离和聚类分析

根据四个群体之间 Nei's 遗传距离 (表 5) 用 UPGMA 方法对群体进行聚类分析, 得到图 2 所示的聚类分析图, 根据这个图可以很清晰的看到, 黄岛群体与前三岛群体先聚在一起, 再与蓬莱群体聚类, 最后与韩国群体聚类。韩国群体与中国三个群体的遗传背景有较大的不同。

表 5 魁蚶四个群体之间的遗传距离与遗传相似性指数

Table 5 Genetic distance and genetic identity of the four *S. broughtonii* populations

Population ID	Korea	SHD	SP	JQ
Korea	****	0.8887	0.8762	0.8892
SHD	0.1180	****	0.9494	0.9944
SP	0.1321	0.0520	****	0.9482
JQ	0.1174	0.0057	0.0532	****

注：对角线下方数据表示遗传距离，对角线上方数据表示遗传相似性指数

Note: Above diagonal: Nei's genetic identity; Below diagonal: genetic distance

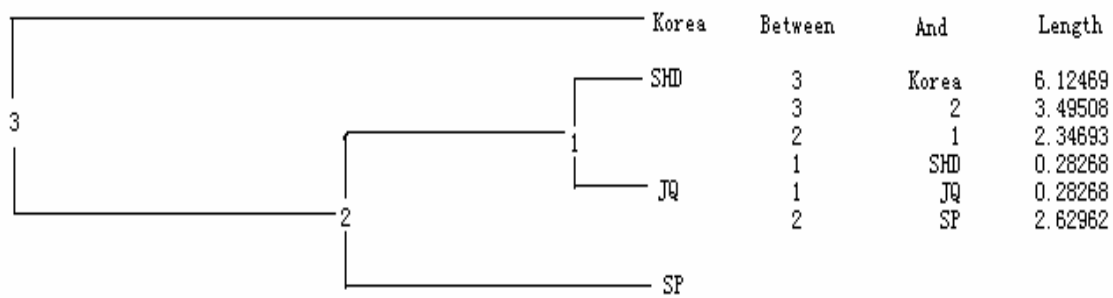


图 2 魁蚶四个群体基于 Nei's (1972)遗传距离的聚类分析图

Fig.2 UPGMA dendrogram of the four *S. broughtonii* populations based on Nei's genetic distance

3 讨论

3.1 RAPD 技术和四个群体魁蚶遗传多样性

RAPD 分子标记是检测种质遗传多样性的有效手段,多态位点的比例是种群遗传多样性的一个重要指标。么宗利(2005)等对我国五个青蛤地理群体进行 RAPD 分析发现青蛤的平均多态位点比例为 70.82%,平均遗传多态度为 0.278,表现出较高的遗传多样性。沈怀舜(2003)等研究发现,三个文蛤地理种群的多态位点比例为 80%,多态性比例比其他的海洋生物都大的多。在魁蚶遗传群体遗传多样性研究中,喻子牛(1997,1998)采用了淀粉凝胶电泳技术对秦皇岛、大连、青岛、韩国釜山 4 个魁蚶群体样本的等位基因酶遗传变异研究发现,在四个群体的 10-12 种等位基因酶中分别检测到了 22、26、22、27 个基因位点,四个群体的多态位点比例分别为 50.00%、57.69%、45.50%和 62.96%,对青岛近海魁蚶群体等位基因酶遗传变异进行研究,在检测出的基因座位中,多态位点比例为 45.5%。基因位点的多态位点比例低于本实验 RAPD 的结果。由于等位基因酶电泳只能检测编码蛋白的基因位点,对非结构的基因则不能检测,而且分析的遗传点数目不会很多,只占整个基因组的很小部分。所以,酶电泳可能会低估遗传变异水平。而 RAPD 对编码和非编码蛋白质的基因都可以检测,并且能够覆盖整个基因组,在这方面具有很大的优势。本研究得到四个魁蚶群体的平均多态性位点比例为 97.66%,Shannon's 多样性指数在 $0.460\pm 0.232 \sim 0.491\pm 0.214$ 之间,Nei's 多样性指数在 $0.308\pm 0.171 \sim 0.331\pm 0.199$ 之间,说明魁蚶四个群体遗传多样性仍处于较高的水平。

3.2 四个魁蚶群体遗传分化和聚类分析

四个魁蚶群体间的遗传分化指数表明,韩国群体与中国的三个群体的遗传分化程度较高,分别为 0.106、0.121、0.107,黄岛群体与前三岛群体分化最低,为 0.006,遗传关系很近,这与根据 Nei's 的遗传距离用 PUGMA 做出的聚类分析图结果一致。通过两两群体间遗传分化水平显著性检验也表明,

韩国群体与中国三个群体之间的遗传分化指数显著高于中国三个群体间的遗传分化指数($\alpha=0.05$),说明韩国群体与中国三个群体遗传分化较大。在中国三个群体中,蓬莱群体与前三岛群体之间的分化指数和蓬莱群体与黄岛群体之间的分化指数并无显著差异,而黄岛群体与前三岛群体之间的分化指数显著低于蓬莱群体与前三岛、黄岛群体之间的遗传分化指数,说明黄岛群体与前三岛群体之间的遗传分化最低。这可能是由于黄岛群体与前三岛群体地理距离最近,群体间基因交流的机会很大,而黄岛和前三岛两个群体与蓬莱群体和韩国群体被地理屏障所隔开,阻断了基因流动。反映为地理距离与群体的遗传距离基本一致,这与么宗利等(2004)、刘必谦等(1998)、杜晓东等(2004)、Eun-Seob Cho(2007)对青蛤(*Cyclina sieuisis*)、大连湾牡蛎(*Cassostrea talienwhanensis*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)、魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的研究结果基本一致。喻子牛(1998)对韩国釜山、青岛、秦皇岛、大连四个魁蚶群体样本的等位基因酶的遗传变异进行研究,发现韩国群体其他的三个群体存在着较大遗传差异,同样说明这种遗传差异与地理距离存在一定的关系。Eun-Seob Cho(2007)对俄罗斯、韩国、中国三个地理区域的魁蚶群体研究结果也表明不同地理区域的魁蚶群体有较为明显的遗传分化。

遗传物质变化所造成的变异是生物进化的原始材料,被分隔的种群接受自然选择,逐渐适应不同的生活环境,使遗传结构发生分化,形成独特的基因频率或基因,随着隔离的时间的增长,自然选择和变异作用时间也越长,就会造成物种不同地理种群遗传上的差异。另外,魁蚶具有浮游幼虫生活史,易受洋流的影响,群体结构会由所处的洋流环境的不同而有差异。

在生产实践中,韩国魁蚶表现出来较中国魁蚶优越的生物学性状,基于本研究结果,韩国魁蚶与中国魁蚶群体在遗传上确有差异,说明这种差异可能是造成韩国魁蚶较中国魁蚶优越的生物学性状的原因。在下一步的生产过程中可以采用杂交、选择等手段提高魁蚶优良性状,并且可以更进一步探索造成这种差异更确切的原因。RAPD是显性标记,只能区分显性(有带)和隐性(无扩增带),但是不能区分纯合型和杂合型,在下一步育种工作应用中可以结合其他分子标记(SSR等),联系生长等经济性状进行魁蚶种质改良,并监测魁蚶在养殖过程中遗传多样性的变化。

参考文献

- 么宗利,周凯,来琦芳,王慧,夏连军.我国五个青蛤地理群体遗传变异的RAPD分析[J].海洋渔业,2005,27(2):102-108.
- 王庆恒,杜晓东,李康.光裸星虫遗传多样性的RAPD分析.海洋水产研究,2006,27(3):57-61.
- 刘世禄,杨爱国.中国主要海产贝类健康养殖技术[M].北京,海洋出版社,2005.176-177.
- 刘宝忠,宋林生,相建海.海湾扇贝样品不同保存条件下DNA的提取及RAPD扩增比较[J].海洋科学,2001,25(3):51-53
- 刘红蕾,松林生,刘宝忠,崔朝霞,相建海,刘升平,曲善村,姜广亮.栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势[J].海洋与湖沼,2002,33(2):188-195.
- 刘萍,何玉英,孙昭宁,李健,王清印.中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆.海洋水产研究,2007,28(2):1-6.
- 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.
- 杜晓东,邓岳文,叶富良,王辉.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.

- 沈怀舜,朱健一,丁亚平,陈国耀,陆勤勤,朱庙先,许璞.我国沿海三个文蛤地理群的RAPD分析[J].海洋学报,2003,25(5):97-102.
- 高悦勉,孙洋,才慧梅.三种扇贝遗传结构的RAPD分析.海洋水产研究,2007,28(6):25-31.
- 常亚青,丁君,邢莲蓉,宋林生,倪多娇.用RAPD技术对5种经济海胆基因组DNA多态性研究[J].中国水产科学,2004,11(2):129-134.
- 喻子牛,杨锐,孔晓喻,王如才,刘必谦.青岛近海魁蚶群体等位基因酶遗传变异研究[J].海洋湖沼通报,1997,3:33-38.
- 喻子牛,孔晓瑜,杨锐,陈再忠,刘必谦,王如才.魁蚶等位基因酶遗传变异研究[J].青岛海洋大学学报,1998,28(1):51-58.
- Carcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use in penaeid(*penaeus monodon*) breeding programs[J].Aquaculture, 1995, 130:137-144.
- Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, Simons A J, Powell W. Detection of genetic variation between and within populations of *Glycymeris maculata* using RAPD Markers.Heredity, 1992, 69: 465-472.
- Eun-Seob Cho, Choon-Goon Jung, Sang-Gyu Sohn, Chul-Won Kim, Seock-Jung Han. Population Genetic Structure of the Ark Shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia Based on COI Gene Sequences.Marine Biotechnology, 2007, 9:203-216.
- Nei, M.1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3321-3323.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Amer. Naturalist 106, 283-292.
- Patweny M U, Kenchington E L, Bird C J, et al. The use of RAPD markers in genetic studies of the sea scallop *Platyopecten magellanicus*[J].J Shellfish res,1994,13(2):547-553.