

野生马氏珠母贝子一代的遗传多样性*

丁小雷^① 邓凤姣^{①**} 王爱民^② 叶力^② 阎冰^② 邹准^① 张锡元^①

(^①武汉大学生命科学学院动物发育与遗传研究室 武汉 430072; ^②广西省北海海洋研究所 北海 536000)

摘要: 分析了海南省三亚与广西省北海两地野生贝群体内交配所得子代两群体(SS、BB)和群体间交配(SS_♀ × BB_♂ → BS)所得子代群体(BS)各 8 个个体的遗传多样性。筛选的 20 个含 10 碱基的随机引物中, 其中 14 个产生稳定的可重复的多态扩增结果, 共检测出 124 个位点。用修正的 Shannon 表型多态性指数量化三个群体的遗传多态度, SS、BB、BS 三群体的多态度分别为 0.247, 0.237, 0.261。SS 与 BB, SS 与 BS, BB 与 BS 三群体间的遗传相似度分别为 87.24%, 80.39%, 83.90%。讨论了不同地域之间进行马氏珠母贝育种及遗传多样性保护工作的可行性。

关键词: 马氏珠母贝; 育种; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2003)01-02-06

Genetic Diversity of Two Wild *Pinctata martensi* Populations' F1 Generations

DING Xiao-Lei^① DENG Feng-Jiao^① WANG Ai-Min^② YE Li^②

YAN Bing^② ZOU Zhun^① ZHANG Xi-Yuan^①

(^① College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072;

^② Guangxi Ocean Institute, Beihai 536000, China)

Abstract: *Pinctata martensi* is one of the most important seashells in the southeast of China. In order to improve our understanding of this species and the efficiency of breeding by marker-assisted selection, we used 20 primers to test different populations with the RAPD technique. We randomly collected wild individuals in Sanya (SS), Hainan Province and Beihai (BB), Guangxi Province. We allowed both intra and inter-population mating (SS_♀ × BB_♂ → BS) among these individuals, getting three filial populations known as SS, BB and SB. Among the 20 primers, 14 produced highly reproducible profiles and generated 124 bands among the three filial populations. The genetic diversity index of the three populations (SS, BB and SB) was 0.247, 0.237 and 0.261 respectively. Genetic similarity between the two populations (SS with BB, SS with SB, BB with SB) was 87.24%, 80.39%, 83.90%. Finally, we analyzed the feasibility of interbreeding individuals from these two different areas.

Key words: *Pinctata martensi*; Breeding; Genetic diversity; RAPD

* 国家自然科学基金地方重点资助项目(No. 39969003);

** 通讯作者, E-mail: fish4@whu.edu.cn;

第一作者介绍 丁小雷, 男, 25 岁, 硕士; 研究方向: 动物分子生物学。

收稿日期: 2002-04-15, 修回日期: 2002-11-10

马氏珠母贝 (*Pinctata martensi*) 又称合浦珠母贝, 主要分布在我国广东、广西、海南、台湾及日本沿海, 是我国南方海水育珠的主要经济贝类, 所产珍珠有很好的药用价值, 又是名贵的装饰品; 其脏器含丰富的氨基酸与微量元素, 营养价值特别丰富^[1]。近年来, 一方面由于过度捕捞与栖息环境的恶化, 另一方面由于广东、广西两省在忽略其遗传背景的情况下进行大面积人工养殖并连续地从野生贝类中应用提纯复壮技术, 使我国近海马氏珠母贝物种资源受到严重破坏, 人工养殖品种个体变小, 育珠质量下降, 严重阻碍我国水产养殖业的健康发展。要改变这种局面, 必须开展马氏珠母贝的遗传改良和优良品种的培育工作。传统的贝类育种工作根据贝壳的大小、颜色以及珍珠的质量进行, 但只是依据这些表面性状进行育种存在着很大的盲目性。因此, 研究分析马氏珠母贝遗传多样性参数, 可为其种质资源保护、分子标记辅助选择育种及人工增殖放流等提供科学依据。

随机扩增多态 DNA 技术 (RAPD) 具有快捷方便和较高多态性等特点, 已被广泛应用于多种海洋无脊椎动物如虾、牡蛎等遗传多样性与遗传育种等领域的研究^[2,3]。对于马氏珠母贝, 仅见于王爱民对不同几个地理区域种群多样性的研究^[4], 证明了马氏珠母贝的遗传多样性具有明显的地理区域性, 此外对有关马氏珠母贝的遗传参数知之甚少。本文利用 RAPD 技术对海南省三亚野生种群内交配子代 (SS)、广西省北海野生种群内交配子代 (BB) 及两地群体间交配 (SS_♀ × BB_♂ → BS) 所得 F1 代三群体的遗传多样性进行了研究, 以寻找杂交子代优势形成的分子基础, 改变在养殖中长期从本地野生贝中使用复壮技术的局面。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 亲本野生群体分别取自海南省三亚 (SS)、广西省北海 (BB) 近海海域 3 龄成贝。解剖后人工采精、采卵, 进行群体内交配得到子代两群体 SS、BB, 群体间交配 (SS_♀ × BB_♂ → BS) 得到子代群体 BS。在 31℃, 盐度 34‰,

pH 值 9.0 的含氨海水中人工诱导受精、孵化培养。随机选取子代三群体 (20 月龄) 各 8 个个体, 分别记为 SS、BB、BS。取新鲜闭壳肌组织, 75% 的酒精固定, -20℃ 保存备用。

同时, 对同期培养的 SS、BB 与 BS 三群体的表型数据 (壳长、壳宽、壳厚与总体重) 进行了统计, 结果列于表 4。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增 基因组 DNA 提取。取个体闭壳肌组织 0.2 g, 0.8% 生理盐水漂洗, 冷冻匀浆, 加 800 μl SDS 裂解缓冲液与蛋白酶 K (终浓度 200 μg/ml), 55℃ 水浴消化 20 h。参考《分子克隆实验指南》提取 DNA^[5]。紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

PCR 扩增反应参照 Williams、Welsh^[6,7] 的方法。反应总体积 25 μl 含有 Tris-HCl 10 mmol/L (pH 8.3), KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 22.5 mmol/L, dNTPs 200 μmol/L, 明胶 0.01%, 引物 15 ng (Operon 公司的 OPM 与 OPN 组引物, 筛选出的引物编号及序列见表 1), *Taq* 酶 1.0 U。反应程序为: 94℃ 下预变性 300 s, 95℃ 变性 40 s, 37℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 47 个循环, 循环结束后在 72℃ 延伸 500 s。

同一引物对 24 个样品 (每个群体 8 个样品) 进行同批次扩增, 扩增产物在同一块 1.8% 的琼脂糖凝胶上电泳 (1 × TAE, 3 V/cm 恒稳电压), 溴化乙锭显色, 紫外透射仪观察摄影。

表 1 筛选出的 14 个随机引物编号及其序列

引物	序列 (5' - 3')	引物	序列 (5' - 3')
OPM2	- ACAACGCCTC -	OPM19	- CCTTCAGGCA -
OPM4	- GGCGGTGTC -	OPM20	- AGTCTTGGG -
OPM6	- CTGGCCAACT -	OPN2	- ACCAGGGGCA -
OPM7	- CCGTACTCA -	OPN7	- CAGCCAGAG -
OPM12	- GGGAGGTGG -	OPN15	- CAGCGAGTGT -
OPM14	- AGGTCGTTTC -	OPN16	- AAGCGACCTG -
OPM17	- TCACTCCGGG -	OPN19	- GTCCCTACTG -

1.3 数据统计 电泳图谱中的每一条带记为一个位点, 当某一扩增带出现时记为 1, 缺失记为 0, 从而建立原始谱带矩阵, 并据此统计位点总数、多态位点数和每个多态位点在群体中的分布频率。群体的多态位点比例 P 为:

$$P = (\text{该群体的多态位点数} / \text{位点总数}) \times 100\%$$

以 Shannon 表型多样性指数量化遗传多态度^[8]:

$$H' = - \sum X_i \ln X_i$$

若将单态位点、所采用的引物数量多寡加以考虑,将上式修改为:

$$H_0 = - (\sum X_i \ln X_i) / N$$

X_i 为位点 i 在某一群体中出现的频率, N 为在该群体中检测到的总位点数。 H_0 为平均遗传多态度,可以用来分析和比较群体间的遗传多样性。

两群体间的遗传相似度 F 及遗传距离 D 根据 Lynch^[9] 计算方法: X_{ab} 为群体 a 和群体 b 的共享位点; X_a 和 X_b 分别为群体 a 和群体 b 的位点总数。

$$F = 2X_{ab} / (X_a + X_b), \quad D = 1 - F$$

2 结果

2.1 RAPD 标记结果 在选用的 20 个 10 碱基对的随机引物中选取 14 个引物用于三群体共计 24 个个体进行遗传多样性分析。共记录了 124 个位点,扩增片段大小在 2 000 bp 与 800 bp 之间。每个引物均扩增出多态性位点,检测出的多态位点百分率在 75% ~ 100% 之间,因引物而异。SS、BB、BS 三群体的多态位点比例分别是 82.0%、76.7%、87.5%。扩增结果统计的数据列于表 2。图 1 为引物 OPM20 对三群体扩增的电泳图谱。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

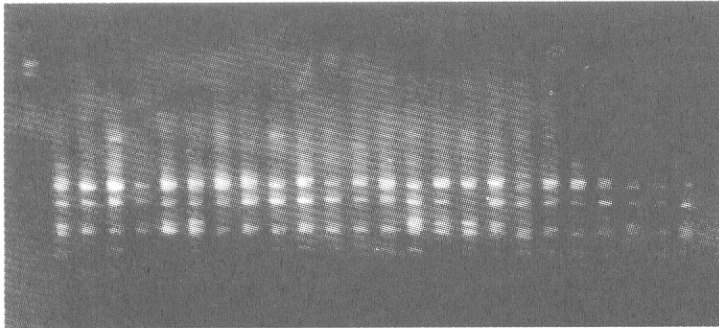


图 1 引物 OPM20 对 SS、BB 与 BS 三群体随机扩增的电泳图谱

Marker: λ /EcoR I + Hind III marker; 1 ~ 8: SS; 9 ~ 16: BB; 17 ~ 24: BS

表 2 筛选出的 14 种随机引物对三个群体基因组扩增产物结果

引物	位点数	SS		BB		BS		多态位点百分比
		位点数	变异位点数	位点数	变异位点数	位点数	变异位点数	
OPM2	10	8	6	8	6	7	6	85.6
OPM4	5	5	4	4	3	4	3	75
OPM6	8	7	7	6	5	6	6	100
OPM7	13	9	7	11	8	10	9	90
OPM12	7	7	6	7	4	6	5	85.6
OPM14	12	10	9	9	8	12	10	90
OPM17	5	4	3	5	4	4	3	80
OPM19	8	6	6	6	6	8	7	100
OPM20	12	8	5	9	6	12	9	75
OPN2	8	7	6	7	4	8	7	87.5
OPN7	10	8	8	7	6	6	6	100
OPN15	10	7	3	8	5	7	6	85.6
OPN16	8	7	6	8	7	7	6	87.5
OPN19	8	7	6	8	7	7	6	85.6
合计	124	100	82	103	79	104	91	

修正后的 Shannon 多态性指数方程,对筛选的 14 种引物所检测到的表型频率进行遗传多态度分析,结果如表 3。SS、BB、BS 的平均遗传多态度 (H_0) 分别是: 0.247, 0.237, 0.261, 三亚种群子代高于北海种群子代,两地区间交配子代的多态度最高。

通过对三群体间的遗传相似度计算分析, SS 与 BB、SS 与 BS、BB 与 BS 群体之间的遗传相似度分别是 87.24%, 80.39%, 83.90%; 遗传距离分别是 0.127 6, 0.196 1, 0.161 0。

2.2 三群体的表型数据统计 对同期培养三群体(SS: 115 个; BB: 116 个; BS: 120 个样品)的壳长、壳宽、壳厚、软体重与平均体重进行了统计,求得各参数的平均值及偏差见表 4。可以看出 BS 群体的各参数高于 SS、BB 群体,表明了同样的培养条件下,BS 群体在生长方面较

SS 与 BB 群体有一定的优势。

表 3 筛选出的 14 个引物在三群体中的多态度分析结果

引物	H_0 (SS)	H_0 (BB)	H_0 (BS)	H_0 (平均)
OPM2	0.256	0.250	0.247	0.251
OPM4	0.277	0.274	0.259	0.262
OPM6	0.263	0.309	0.236	0.269
OPM7	0.219	0.166	0.264	0.216
OPM12	0.295	0.307	0.299	0.288
OPM14	0.317	0.251	0.329	0.299
OPM17	0.219	0.253	0.317	0.263
OPM19	0.287	0.265	0.269	0.274
OPM20	0.211	0.198	0.203	0.204
OPN2	0.176	0.135	0.189	0.167
OPN7	0.303	0.309	0.334	0.315
OPN15	0.189	0.186	0.245	0.207
OPN16	0.178	0.150	0.183	0.170
OPN19	0.273	0.263	0.276	0.271
均值	0.247	0.237	0.261	0.248

表 4 BB、SS、BS 三群体样品表型数据统计

群体	样品个数	壳长(mm)	壳宽(mm)	壳厚(mm)	软体重(g)	平均体重(g)
SS	115	47.0 ± 4.7	42.6 ± 4.0	19.9 ± 2.0	5.22 ± 1.72	13.79 ± 3.48
BB	116	48.6 ± 4.6	43.7 ± 4.5	20.5 ± 1.9	5.62 ± 1.75	14.45 ± 3.49
BS	120	49.2 ± 5.6	43.9 ± 5.3	20.2 ± 2.1	6.42 ± 2.34	15.45 ± 4.04

3 讨论

3.1 材料选择 在人工养殖过程中,最重要的是保持和提高品系优良的经济性状,使其在后代中更加稳定。在马氏珠母贝的遗传育种研究中,魏贻光^[10]、李刚^[11]等曾在马氏珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝三种主要的海产珍珠养殖贝间进行种间杂交研究,但是结果并不理想,两种贝的杂交一代的生活力显示不出明显的优势,受精率低且幼虫极少能够发育至壳顶初期。海南省三亚与广西省北海分属热带海洋性气候和亚热带海洋性气候,两地纬度相差较大,环境有很多不同。陈来钊^[12]等研究了贝类杂交与温度的关系,证明了早期胚胎发育受母体生活环境温度的影响。综合以上几点因素,本实验选择海南省三亚野生马氏珠母贝作为父本,广西省北海野生马氏珠母贝作为母本,进行种内杂交育种及其遗传多样性保护研究。

3.2 群体内自交子代遗传结构分析 从表 3 可知,广西省北海群体的遗传多态度 0.237 小于海南省三亚群体的多态度 0.247,体现了地域差异导致种群间在遗传结构上的差异,即北海群体基因杂合度小于三亚群体。广西省北部湾的北海、合浦沿海一带属亚热带气候,海水年平均气温 23.6℃,海水的 pH 值为 8~8.3 之间,浮游生物饵料资源十分丰富,浅海面积 4 万多公顷,海水的生态环境十分适合马氏珠母贝生长繁殖,但是近几年海水人工养殖品种个体变小,育珠质量下降。造成这种情况的原因一方面可能是由于最近二、三年来在广西省沿岸推广大面积养殖,连续从本地域野生种群中使用复壮技术,造成产生的种苗在一定的范围内常常源于数量十分有限的亲贝。近交及遗传漂变在一定程度上发生于人工累代亲贝繁育体系,导致养殖或人工放流基因库发生不良的变化;另一方面可能是受广西省近海环境条件改变的影

响。温度、海水盐度及其它环境因素的综合效益对马氏珠母贝成活率及生长至关重要^[13,14]。近年来由于近海水域周围大量围垦及建设用地,大量泥沙沉积,改变了场内水体深度,养虾池大量富营养水侵入,周围人口增加,生活污水等流入海域等环境的改变使贝的生长、发育受到影响,导致其对环境的适应能力、抗病能力的下降,这对马氏珠母贝的生存无疑是一种威胁。所有这些原因都有可能直接导致人工养殖贝个体体积的变小,育珠质量下降,野生种群基因库多态度的下降。

3.3 群体间交配子代遗传结构分析 广西省北海与海南省三亚两地马氏珠母贝群体间交配所得子代 BS 的遗传多态度是 0.261,高于群体内交配所得子代的遗传多态度(BB:0.237;SS:0.247),BS 与 BB 的遗传相似度 83.90%略高于 BS 与 SS 的遗传相似度 80.39%。这说明了两群体间交配改变了后代的基因组合,增加了基因的杂合度,改变了不同位点上的基因互作。根据杂种优势的显性学说,基因型与环境之间存在着一种相互协调的平衡,基因的杂合性能够提高机体的生活力、繁殖力和生长速度等,所以群体间交配子代在养殖中应具有一定的生长、抗病等方面的优势。从表 4 对三群体的表型数据统计结果来看,BS 群体的各参数(壳长、壳宽、壳厚、软体重与平均体重)高于 SS、BB 群体,这证明了 BS 较 SS、BB 群体有一定的生长优势。

1995 年在美国水产科学年会上总结出避免因瓶颈作用和遗传漂变造成的遗传多样性的降低,简单而又行之有效的方法是选用足够大的、有代表性的亲本种群及合适的繁育策略^[15]。我们这种群体间交配是属于选择健康有代表性的贝作为亲本,后代不存在对当地野生种群的遗传资源造成污染的可能。若两地杂交后代能够在新的环境下产生稳定的优良性状,这种不同地理区域的种群间杂交可改变长期依赖的从本地野生贝取材的复壮技术,这样既可保护本地区种群的多态性,又可提高养殖的经济效益。

3.4 RAPD 技术讨论 随机引物扩增多态性分析,由于在反应中各成分的动态相互作用及外界因素的影响,使之稳定性较差,这也是研究者普遍关注的问题。但是我们经过严格的条件控制,如在同样的条件下提取与处理模板,做到每个引物对 24 个样本(SS、BB 与 BS 各 8 个)使用同一批次试剂且同批次扩增,扩增产物在同一块胶上电泳等,可将干扰因素降低到最低限度,能够得到重复性强的有意义的结果。

参 考 文 献

- [1] 章超群,吴红棉等.马氏珠母贝肉的营养成分及游离氨基酸组成.水产学报,2000,24(2):180~184.
- [2] 宋林生,相建海等.用 RAPD 标记研究对虾六个种属间的亲缘关系.动物学报,1998,43(3):353~359.
- [3] 刘必谦,戴继勋等.巨蜆属牡蛎遗传多样性研究.水产学报,1998,22(3):193~198.
- [4] 王爱民,邓凤姣等.马氏珠母贝的遗传多样性的 RAPD 分析.武汉大学学报(自然科学版),2000,46(4):467~470.
- [5] 萨姆布鲁克,费里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T(著)(金冬雁,黎孟枫等译).分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社,1996.464~468.
- [6] Williams J G K, Kubelik A R, Liak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6 531 ~ 6 535.
- [7] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7 213 ~ 7 218.
- [8] Wachira F N. Detection of genetic in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 1995, 38: 201.
- [9] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 478.
- [10] 魏贻尧,姜卫国.三种珠母贝种间杂交的初步研究.见:中国贝类学会编,贝类学论文集(第二辑).北京:科学出版社,1984.215~216.
- [11] 李刚,姜卫国等.合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究 II.受精过程和杂交后代的染色体观察.热带海洋,1983,2(4):316~320.
- [12] 陈来钊,王子臣.温度对海湾扇贝与虾夷扇贝及其杂交受精、胚胎和早期幼体发育的影响.大连水产学院学

报, 1994, 9(4): 1 ~ 9.

- [13] 金启增, 姜卫国, 谢玉坎. 水温变化对合浦珠母贝心脏搏动的影响. 见: 中国贝类学会编, 贝类学论文集(第二辑). 北京: 科学出版社, 1984. 24 ~ 29.
- [14] 郑成兴, 黄宗国. 大亚湾核电站附近水域马氏珠母贝种

群生态. 动物学报, 1997, 43(3): 271 ~ 278.

- [15] Blankenship H L. A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium*, 1995, 15: 001.