

文章编号: 1674-5566(2011)05-0655-06

中国沿海管角螺 4 个自然群体遗传多样性的 RAPD 分析

罗福广, 苏翔驹, 区小玲, 李斌, 潘英, 郑惠芳, 覃志彪

(广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 利用 RAPD 技术对管角螺 (*Hemifusus tuba* Gmelin) 4 个自然群体(广西北海、广东湛江、浙江温州、江苏连云港)的遗传多样性进行了分析。所选择的 19 条有效引物在 4 个自然群体 200 个个体中总共产生 182 个扩增片段, 片段数量为 19 983 个, 片段大小在 250~2 500 bp 之间。其中每条引物可产生 4~17 条带, 平均 5.28 个位点。4 个自然群体共检测到 149 个多态位点, 多态位点比例为 81.87%, 其中北海群体的多态位点比例最高, 占 66.48%, 其次是湛江群体为 47.25%, 温州群体为 44.51%, 连云港群体为 36.81%。4 个群体中均未检测到各群体特有的扩增带。4 个自然群体管角螺的 Nei's 指数和 Shannon 指数表现为一致性, 表明遗传多样性在 4 个自然群体的大小为北海群体 > 湛江群体 > 温州群体 > 连云港群体。4 个自然群体的遗传距离在 0.0542~0.1374 之间。基于群体间遗传距离的值进行聚类分析, 结果表明, 4 个群体中, 北海与湛江群体首先聚在一起, 温州与连云港群体随后聚在一起, 最后 4 个群体聚在一起。

研究亮点: 利用 RAPD 技术首次对我国管角螺 4 个不同分布区自然群体的 DNA 多态性进行种内遗传差异分析, 并探讨其遗传多样性和地理分化特征。结果表明, 管角螺 4 个自然群体目前尚保持了较高的遗传多样性, 但环境污染和不合理的捕捞方式都可能导致遗传多样性的降低。管角螺的遗传变异主要来自群体内个体间, 少部分存在群体间, 各群体具有较大的遗传变异潜力。

关键词: 管角螺; 遗传多样性; 遗传距离; RAPD

中图分类号: S 917

文献标志码: A

管角螺 (*Hemifusus tuba* Gmelin) 隶属腹足纲 (Gastropoda)、盔螺科 (Galeodae)、角螺属 (*Hemifusus*), 俗称角螺、响螺、海螺和号螺, 为热带和亚热带浅海暖水性较大型的经济腹足类。在我国主要分布在浙江、江苏、广西和广东等各省的沿海地区。近年来, 由于过度采捕, 近海环境污染, 我国沿海管角螺自然资源大大减少。为确保该种群的可持续开发利用, 须对其生物学、种群遗传学以及群体生态学等有很好的了解。而国内外有关管角螺的研究报道主要在生物学和生态学方面, 如国外主要报道了管角螺的摄食、繁殖、摄食及饥饿对其幼体的影响、幼螺生长及种内残杀^[1-3]、呼吸和循环方面的动力学^[4]; 国内主要集中在繁殖发育^[5-9]、人工育苗^[10-11]、

生态习性^[12-13]、营养成分分析^[14-16] 和生化代谢^[17-20]、染色体核型研究^[21] 等。

目前, 国内外利用分子标记技术进行管角螺种质鉴别的研究未见报道, 尽管 LI 等成功分离出 10 个具有多态的管角螺微卫星标记, 但有关管角螺在种群遗传学研究方面一直是空白。国内外对管角螺的遗传背景知之甚少, 对其遗传多样性研究十分迫切。本研究通过 RAPD 技术分析我国管角螺 4 个不同分布区自然群体的 DNA 多态性, 并探讨其遗传多样性和地理分化特征, 以期为该种群的大规模人工繁育、养殖提供基础理论依据, 为我国管角螺种质资源的开发、种群识别、增殖放流和合理保护提供资料。

收稿日期: 2010-11-06 修回日期: 2011-05-23

基金项目: 国家自然科学基金(31060353); 广西科学研究与技术开发计划项目(0718003-3-6)

作者简介: 罗福广(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋贝类遗传育种。E-mail: 55141408@qq.com

通讯作者: 潘英, E-mail: npying@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料

2007年8月-2008年3月分别从广西北海(BH)涠洲岛、广东湛江(ZJ)特呈岛、浙江温州(WZ)乐清和江苏连云港(LYG)墟沟4个沿海地区随机采集管角螺的自然群体,每群体50个个体(图1)。活体低温运输至实验室后,待其恢复活动能力,迅速切下伸出足肌部分,削去外皮并切成若干份1 g左右的小块,放入装有600 μL无水乙醇的1.5 mL的灭菌EP管中,摇匀后标记,于-20℃保存。

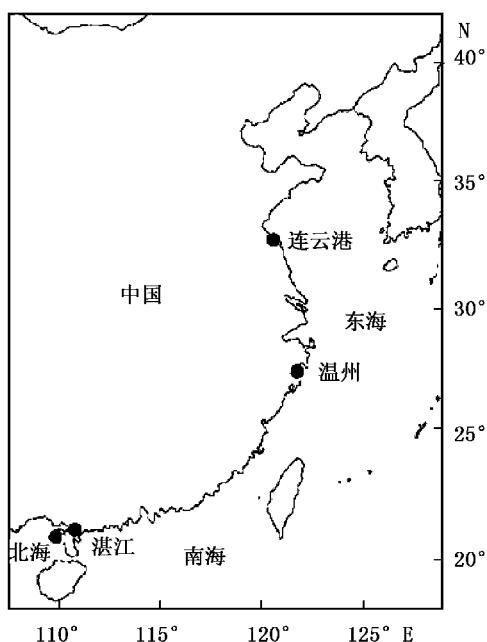


图1 管角螺样品采集地点(比例尺1:27000000)

Fig. 1 Sample sites of *H. tuba* along the coast of China (scale 1:27000000)

1.2 基因组DNA的制备

基因组DNA提取参照《分子克隆实验指南》^[22]。剪取50 mg左右样品腹足肌肉组织,放入装有460 μL STE溶液(1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 250 mmol/L EDTA-Na₂, pH 8.0; 5 mol/L NaCl)、30 μL 10% SDS、10 μL蛋白酶K(10 mg/mL)的1.5 mL灭菌EP管中,剪碎并震荡混匀,标记后56℃消化过夜;加入胰消化酶1 U 37℃消化1 h后65℃灭活10 min,冷却至常温;加入等体积Tris-HCl饱和酚溶液,轻摇5 min,12 000 r/min(4℃)离心15 min,小心吸取上清于另一支1.5 mL灭菌离心管中,重复一次;加入等体积的

氯仿:异戊醇(24:1),轻摇5 min,12 000 r/min(4℃)离心15 min,小心吸取上清于另一支1.5 mL灭菌离心管中,重复一次;加入2倍体积的冰冻无水乙醇,颠倒摇动数次至DNA絮状析出,-20℃冰冻4 h。12 000 r/min离心3 min,使DNA沉于管底,将管内液体小心倾出;加入等体积的冰冻70%乙醇洗涤,小心倾去乙醇,重复一次,自然风干;加入100 μL ddH₂O溶解DNA,置于4℃冰箱保存备用。

1.3 随机引物的筛选

所有引物(10 bp)购自上海生工生物工程技术服务有限公司,共筛选50个随机引物,其中有扩增条带的引物共31个,经反复检验,共选出19个条带清晰、重复率高的有效引物进行遗传多样性分析。

1.4 RAPD反应与检测

通过预备试验,优化RAPD反应条件。反应总体系为25 μL: Taq Buffer 2.5 μL, dNTP(0.28 mmol/L) 0.7 μL, MgCl₂(2.0 mmol/L) 2.0 μL, Taq酶(1.5 U/μL) 0.3 μL, Primer(1.8 ng/μL) 3.0 μL, DNA模板1.0 μL, ddH₂O 15.5 μL;反应程序:94℃预变性4 min,94℃变性1 min,36℃退火3 min,72℃延伸2 min,45个循环后72℃延伸10 min,最后4℃保存。每个群体选择50个个体作为研究样本,用选择的引物对其进行RAPD扩增。检测时经终产物电泳和溴化乙锭染色后,紫外透射仪上观察,并用凝胶成像系统拍照记录。

1.5 RAPD数据处理

每个样品的扩增情况按扩增带的有(1)或无(0)作记录,形成0、1矩阵,用于统计分析。每条扩增带看作为一个位点,统计扩增总位点数、多态位点数以及多态位点比例数。多态位点比例(*P*)和Shannon多样性指数(*H₀*)^[23]的计算公式为

$$P = r/n \times 100\% \quad (1)$$

$$H_0 = - \sum \pi_i \ln \pi_i \quad (2)$$

式中:*r*为多态位点数;*n*为扩增出的位点总数; π_i 为某一条带在种群中出现的频率。

Nei's^[24]遗传相似度(*F*)和遗传距离(*D*):

$$F = 2N_{xy}/(N_x + N_y) \quad (3)$$

$$D = 1 - F \quad (4)$$

式中:*N_x*和*N_y*分别为*x*和*y*个体的位点数;*N_{xy}*为*x*和*y*两个体共享的位点数。并根据遗传距离

值,采用UPGMA方法对群体进行聚类分析。

应用Arlequin软件中分子方差分析(AMOVA)进行群体遗传变异来源分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD扩增结果

本研究共进行了50个随机引物的扩增,其

中19条有效引物可获得清晰稳定的条带,在4个地理种群200个个体中共产生了182个扩增片段,片段数量为19~983个,片段大小在250~2500 bp之间。其中每条引物可产生4~17个条带,平均每条引物扩增出5.28个位点。引物S40对4个群体管角螺的RAPD扩增结果见图2。

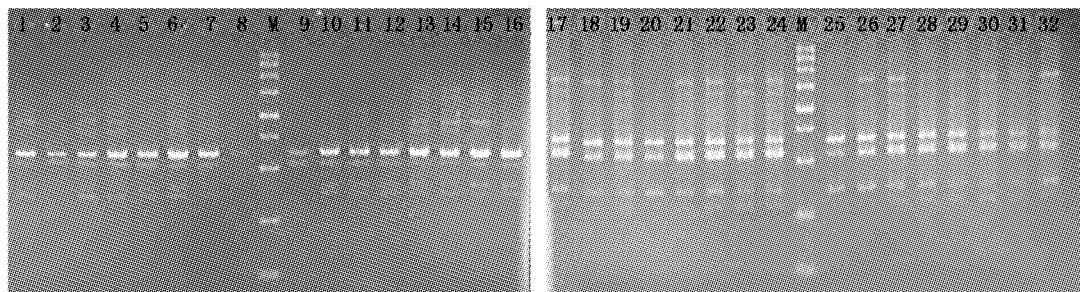


图2 引物 S40 在北海、湛江及温州、连云港群体的扩增图谱

Fig. 2 DNA fragments amplified by the RAPD primer S40 in Beihai, Zhanjiang, Wenzhou, Lianyungang populations

1~8. 北海群体; 9~16. 湛江群体; 17~24. 温州群体; 25~32. 连云港群体; M. 分子量标记。

2.2 遗传多样性分析

4个地理种群共有149个多态位点,多态位点比例为81.87%,北海种群的多态位点比例最高(66.48%),其次是湛江种群(47.25%)、温州种群(44.51%)和连云港种群(36.81%)。在所使用的19条引物中,未发现在不同群体间有差异的扩增图谱,即没有体现群体特异性的扩增

带。遗传多样性指数为:北海种群(0.1482 ± 0.1563)>湛江种群(0.1286 ± 0.1704)>温州种群(0.1126 ± 0.1602)>连云港种群(0.0863 ± 0.1439)(表1)。4个群体的Nei's指数和Shannon指数表现为一致性,其遗传多样性由高到低依次为北海种群>湛江种群>温州种群>连云港种群。

表1 管角螺4个群体的遗传多样性和遗传多样度(平均值±标准差)

Tab.1 Genetic diversity and statistics analysis of genetic variation in the four geographical populations of *H. tuba* (mean ± st. d)

种群	位点数	多态位点数	多态位点比例	遗传多样性指数	等位基因数	有效等位基因数	Shannon 指数
北海	182	121	66.48%	0.1482 ± 0.1563	1.6648 ± 0.4734	1.2223 ± 0.2702	0.2407 ± 0.2314
湛江	182	86	47.25%	0.1286 ± 0.1704	1.4725 ± 0.5006	1.2057 ± 0.3034	0.2014 ± 0.2499
温州	182	81	44.51%	0.1126 ± 0.1602	1.4451 ± 0.4983	1.1775 ± 0.2860	0.1795 ± 0.2360
连云港	182	67	36.81%	0.0863 ± 0.1439	1.3681 ± 0.4836	1.1331 ± 0.2509	0.1393 ± 0.2156
总种群	182	149	81.87%	0.1755 ± 0.1669			

2.3 遗传距离和遗传相似度

根据19条引物的扩增带谱进行统计分析,并计算出4个群体间的遗传相似度和遗传距离,结果见表2。4个地理种群间管角螺的遗传相似度在0.8815~0.9473之间,遗传距离在0.0542~0.1374之间,其中,北海种群与湛江种群的遗传距离最小为0.0542,北海种群和温州

种群之间的遗传距离最大,为0.1374。

2.4 聚类分析

基于遗传距离构建了分子系统树结果表明(图3),北海种群与湛江种群间的遗传距离最近,首先聚在一起,温州种群与连云港种群随后聚在一起,最后4个种群聚在一起。

表2 管角螺4个群体间的遗传距离和遗传相似度

Tab. 2 Genetic similarity (S) and genetic distance (D) among the four populations of *H. tuba*

种群	北海	湛江	温州	连云港
北海		0.947 3	0.871 6	0.916 8
湛江	0.054 2		0.881 5	0.924 4
温州	0.137 4	0.126 1		0.945 3
连云港	0.086 9	0.078 6	0.056 3	

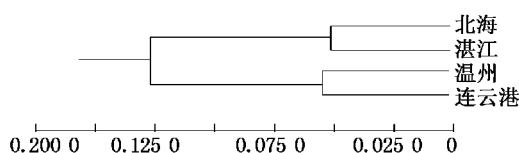


图3 管角螺4个群体的 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram based on the genetic distances of the four populations in *H. tuba*

3 讨论

3.1 管角螺的遗传多样性

迄今,管角螺自然群体的基因组多态性研究未见报道。本文利用 RAPD 方法对管角螺 4 个自然群体进行种内遗传差异分析,结果表明,管角螺的 4 个群体表现为较丰富的遗传多样性水平。不同自然分布区的管角螺遗传多样性水平有一定的差异,其中北海种群的多态位点比例最高。多态位点百分率分析与通过 Nei's 指数和 Shannon 多样性指数检测的遗传多样性一致表明,管角螺 4 个地理种群的遗传多样性由大到小分别为北海种群、湛江种群、温州种群、连云港种群。影响遗传多样性差异的自然因素主要来自地理的区域性^[25~26],人为因素如过度捕捞、环境污染以及人工放流都有可能造成当地遗传多样性的丢失。尽管本研究表明,中国沿海管角螺自然群体目前尚保持了较高的遗传多样性,但环境污染和不合理的捕捞方式都可能导致遗传多样性的降低。

3.2 管角螺 4 个自然群体的亲缘关系比较

群体间遗传相似度与遗传距离指数能反映群体间的亲缘关系。群体间的遗传距离是遗传变异的尺度,群体间的遗传距离随着地理位置的增加而逐渐加大,遗传差异也较大。遗传距离越小,预示着彼此间亲缘关系越近。在本研究中,4 个地理种群的遗传距离在 0.054~0.137,还没有超出 THORPE^[27] 提出的种群间遗传距离是

0.030~0.200 这个范围,表明管角螺各种群之间的亲缘关系非常近,还没有达到分化水平。从地理的角度来看,北海、湛江种群地理相隔近,遗传距离最小;温州、连云港种群地理相隔较近,遗传距离也相对较小;而北海、湛江种群与温州种群的遗传距离都很大,分别为 0.137 4、0.126 1,与连云港种群的遗传距离也较大,分别为 0.086 9、0.078 6。造成这种现象的原因有可能是相邻地理位置的种群存在着基因交流,而相隔较远的地理种群可能因为不同的地理环境、气候、温度和底质等各种海水理化因子差异较大,经过长期的自然选择,必然有较大的遗传变异,揭示种群遗传变异和地理距离、生态环境等有着密切的联系,这在其它水产动物的相关研究中也得到证实^[28~29],符合地理距离产生遗传分化的理论。这可能与管角螺的运动性较差,较少进行长距离迁徙有关。

聚类分析结果也明显地表现出群体间亲缘关系的远近。UPGMA 法显示出北海和湛江群体明显区别于温州和连云港群体。根据种群间遗传距离的大小进行聚类分析的结果与各群体地理位置的远近相符合。本研究也表明,4 个地理种群遗传相似度差异不显著($P > 0.05$),群体的遗传变异不大,种群间有较近的亲缘关系。

基因分化系数(G_{ST})是测定种群遗传分化的主要参数,NEI^[24]定义的这个基因分化系数是为了构造基因多样性(H_T),包括种群内基因多样性(H_S)和种群间基因多样性(D_{ST}),是基因分化相对量的较好测度,但很大程度上依赖于 H_T 值。研究结果显示, $G_{ST} = 0.322 4$ 提示管角螺大部分的遗传变异来源于种群内,种群间也有小部分基因交流,致使种群的基因和基因频率逐渐接近。

3.3 RAPD 结果与形态参数的关联

罗福广等^[30]在对基于管角螺的 10 个形态性状指标的聚类分析、主成分分析中发现,北海与湛江群体形态最近,形态变异差异较小,而温州

与连云港群体较为接近,形态变异差异较大,表明种群的外部形态与地理位置相关,地理相距越远,形态差异越大。这与本文 RAPD 的分析结果也基本吻合。外部形态比较相似的种类在基因组 DNA 上表现出较大的相似性,反之则较小^[28]。

从本研究结果可知,管角螺的遗传变异主要来自群体内个体间,少部分存在群体间,各群体具有较大的遗传变异潜力。管角螺群体的遗传多样性比较丰富,存在着较高程度的遗传变异,种质资源处于良好状态,也表明人工养殖还未对其种质资源造成不利影响。因此,从细胞与分子及个体与群体水平上对管角螺的遗传多样性进行系统深入研究,是管角螺资源保护与人工繁育的基础。今后应采取有效措施防止遗传多样性的丧失,避免养殖或增殖群体与自然群体之间的遗传渐渗以及不同地理群体间的种质混杂,加强对管角螺的遗传资源保护与合理的可持续开发利用。

参考文献:

- [1] MORTON B. Prey preference, capture and ration in *Hemifusus tuba* (Gmelin) (prosobranchia: Melongenidae) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1985, 94: 191–210.
- [2] MORTON B. Reproduction, juvenile growth, consumption and the effects of starvation upon the South China Sea whelk *Hemifusus tuba* (Gmelin) (Prosobranchia: Melongenidae) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1986, 102: 257–280.
- [3] MORTON B. Juvenile growth of the South China Sea whelk *Hemifusus tuba* (Gmelin) (Prosobranchia: Melongenidae) and the importance of sibling cannibalism in estimates of consumption [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1987, 109 (1): 1–14.
- [4] PHILLIPS D J H, DEPLEDGE M H. Circulation, respiration and fluid dynamics in the gastropod mollusc, *Hemifusus tuba* (Gmelin) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1986, 95(1): 1–13.
- [5] 林志华, 王铁杆, 夏彩国. 管角螺生态及繁殖习性观察 [J]. 海洋科学, 1998(5): 11–12.
- [6] 罗杰, 刘楚吾, 黄翔鹄. 盐度对管角螺胚胎发育的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 24–28.
- [7] 杨铭. 角螺的繁殖生物学观察 [J]. 海洋与渔业, 2008 (4): 20–29.
- [8] 潘英, 庞有萍, 罗福广, 等. 管角螺的繁殖生物学 [J]. 水产学报, 2008, 32(2): 217–222.
- [9] 潘英, 陈锋华, 庞有萍, 等. 管角螺的生物学特性及养殖 [J]. 水产科学, 2008, 27(1): 24–26.
- [10] 张正道. 管角螺的人工育苗 [J]. 科学养鱼, 2001(4): 25.
- [11] 潘英, 王强哲, 庞有萍, 等. 管角螺全人工育苗试验 [J]. 水产科技情报, 2007, 34(2): 84–85.
- [12] 陆珠润, 蒋霞敏, 段雪梅, 等. 不同温度、底质和饵料对管角螺孵化和稚、幼螺生长的影响 [J]. 南方水产, 2009, 5(3): 10–14.
- [13] 潘英, 陈锋华, 李斌, 等. 管角螺对几种环境因子的耐受性试验 [J]. 水产科学, 2008, 27(11): 566–569.
- [14] 傅余强, 顾谦群, 刘睿, 等. 管角螺肌肉中性糖蛋白的化学组成及抗肿瘤活性研究 [J]. 中国海洋药物, 2002, 21 (6): 20–24.
- [15] 朱爱意, 赵向炯, 杨运琪. 东海区管角螺软体部的营养成分分析 [J]. 南方水产, 2008, 4(2): 63–68.
- [16] 迟淑艳, 周岐存, 周健斌, 等. 华南沿海5种养殖贝类营养成分的比较分析 [J]. 水产科学, 2007, 26(2): 79–83.
- [17] 罗杰, 刘楚吾, 唐洪超, 等. 温度对管角螺 *Hemifusus tuba* (Gmelin) 耗氧率和排氨率的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(1): 85–88.
- [18] 罗杰, 刘楚吾, 李锋, 等. 盐度及规格对管角螺耗氧率和排氨量的影响 [J]. 海洋科学, 2008, 32(5): 46–50.
- [19] 罗杰, 刘楚吾, 李锋, 等. 管角螺窒息点及昼夜代谢规律 [J]. 应用生态学报, 2008, 19(9): 2092–2096.
- [20] 梁海鹰, 曹伏君, 伍泽妹, 等. 管角螺不同组织同工酶的研究 [J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(6): 22–26.
- [21] 曹伏君, 李长玲, 罗杰, 等. 管角螺、细角螺的核型研究 [J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(1): 15–18.
- [22] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(上册) [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [23] LEWONTIN R C. The apportionments of human diversity [J]. Evolution Biology, 1972, 6: 381–398.
- [24] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1973, 70: 3321–3323.
- [25] 高悦勉, 孙洋, 才慧梅. 3 种扇贝遗传结构的 RAPD 分析 [J]. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 25–31.
- [26] 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 分析 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11 (2): 163–168.
- [27] THORPE J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematic [J]. Annual Review of Ecology Systematics, 1982, 13(2): 139–168.
- [28] 尤仲杰, 包永波, 张爱菊. 中国沿海西施舌 5 个自然群体形态差异和 RAPD 分析 [J]. 海洋学报, 2007, 29(3): 98–104.
- [29] 吴滟, 傅洪拓, 李家乐, 等. 太湖日本沼虾的遗传多样性分析 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 620–624.
- [30] 罗福广, 李斌, 罗平秀, 等. 中国沿海管角螺 4 个自然种群形态差异的比较 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2010, 40(3): 65–70.

RAPD analysis on *Hemifusus tuba* (Gmelin) of four different natural populations in China

LUO Fu-guang, SU Xiang-ju, OU Xiao-ling, LI Bin, PAN Ying, ZHENG Hui-fang, QIN Zhi-biao
(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: Nineteen RAPD primers amplified a total of 182 scorable markers in 200 samples from the four different natural populations of *H. tuba*, thus a total of 19 983 bands which ranged in size from 250 to 2 500 bp were generated showing homogeneous RAPD patterns, and number of scorable bands for each primer varied from 4 to 17 with an average of 5.28 bands per RAPD primer. 81.87% of the total genetic diversity was found among the four populations which contained approximately 149 polymorphic loci. 66.48%, 47.25%, 44.51%, 36.81% of the total genetic diversity were attributable to genetic differences within Beihai, Zhanjiang, Wenzhou, Lianyungang populations. Estimates of Nei's Gene Diversity and the Shannon's Diversity Index provided similar results of diversity, from high to low, that is, Beihai, Zhanjiang, Wenzhou, Lianyungang populations. The cluster analysis of the four populations was based on Genetic Distance, which was measured between 0.0542 – 0.1374. The results showed the populations of Beihai and Zhanjiang first assembled one branch, Wenzhou and Lianyungang then assembled another, and the two branches assembled finally.

Key words: *Hemifusus tuba* (Gmelin); genetic diversity; genetic distance; RAPD

2012年《水产学报》征订启事

《水产学报》是由中国科协主管、中国水产学会主办、科学出版社出版的以反映我国水产科学技术成果为主的学术类核心期刊(中国科学引文数据库CSCD核心库和中信所核心库),1964年创刊,是中国水产科学研究领域历史最为悠久的刊物之一,中国科协“精品科技期刊示范项目”资助期刊。主要刊载水产基础研究、水产养殖和增殖、渔业水域环境保护、水产品保鲜加工与综合利用、渔业机械仪器等方面论文和综述。

本刊为月刊,每期160页,每期订价49.00元,全年订价588.00元。国内统一刊号:CN 31-1283/S,国际标准刊号:ISSN 1000-0615,国内邮发代号:4-297,国外发行代号:M-387。读者可在当地邮政局办理订阅,破季、漏订或补订均可直接与编辑部联系。个人订户可享受6折优惠。

编辑部地址:上海市临港新城沪城环路999号201信箱(邮编:201306)

联系人:张美琼

联系电话与传真:021-61900227

E-mail: mqzhang@shou.edu.cn; jfc@shou.edu.cn

Website: www.scxuebao.cn