

姚韩韩,林志华,周小龙,等. 泥蚶奉化种群与韩国种群形态特征和遗传结构的差异分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):183-186.

泥蚶奉化种群与韩国种群形态特征和遗传结构的差异分析

姚韩韩,林志华,周小龙,顾向飞,董迎辉

(浙江万里学院/浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室,浙江宁波 315100)

摘要:利用形态学标记和微卫星标记技术,研究了泥蚶奉化种群和韩国种群的壳形态和遗传结构的差异,为泥蚶良种培育提供科学依据。对同批 2 龄泥蚶奉化种群和韩国种群的壳长(SL)、壳高(SH)、壳宽(SW)、壳顶宽(SRW)、总质量(TW)、软体部质量(IW)进行测量,以各性状的相对比值作为形态分析指标,考察了 SH/SL、SW/SL、SRW/SL、IW/TW 4 个指标的差异。方差分析和 Tukey 多重比较结果表明,韩国种群的 SW/SL、SRW/SL 2 个形态指标均极显著高于奉化种群($P < 0.01$),表明韩国种群的壳型比奉化种群更加鼓胀;IW/TW 极显著高于奉化种群,表明韩国种群的软体部含量高,即出肉率高。选用 6 个高度多态的微卫星标记分析了泥蚶韩国种群和奉化种群的遗传差异,结果 6 个微卫星位点在 2 个种群中共检测出 64 个等位基因,其中 5 个位点的 PIC 值 > 0.5 ,表现出高度多态性;遗传多样性分析表明,奉化种群和韩国种群在等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、PIC 值等遗传参数上差异很小,遗传分化系数 F_{st} 为 0.022;但 2 个群体的遗传距离为 0.136 7,在 TMP18、ETG7 等位点的等位基因数和期望杂合度等参数上存在显著差异,表明 2 个种群的遗传结构已经发生了一定程度的变异。

关键词:泥蚶;地理种群;形态学标记;微卫星标记;遗传变异

中图分类号: S968.31⁺4;S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0183-04

泥蚶(*Tegillarca granosa*)属于广温广盐性贝类,广泛分布于印度洋-西太平洋,在我国主要分布于山东以南沿海^[1],是我国四大养殖贝类之一,具有很高的经济价值。然而,目前人工繁、养殖的泥蚶种质是未经遗传改良的野生型,已出现了种质退化等制约泥蚶养殖业健康、可持续发展的现象,迫切需要对泥蚶种质进行改良^[2]。杂交育种是遗传改良和良种培育常用的有效方法,通过不同种群、不同基因型个体杂交,其杂交后代不仅可综合双亲的优良性状、增加变异性,还有可能产生超越双亲的杂种优势^[3]。关于海洋经济贝类良种培育方面,已有不少杂交培育成功的先例,特别是不同地理种群间的“远距离杂交”。不同地理种群间的“远距离杂交”可克服种间杂交后代生殖和发育障碍,具有比较明显的性状表达等优点^[4],在海洋经济贝类育种中得到了广泛的应用,如太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[5]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[6-7]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[8]、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[4,9]、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)^[10]、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[11]等均开展过不同地理种群的杂交,而关于泥蚶杂交育种方面的研究国内外还未见报道。然而开展泥蚶不同地理种群的“远距离杂交”的前提是找出杂交亲本的优良

性状,判断是否为远距离杂交的良好材料。杂交亲本的优良性状主要表现在生长速度、形态特征及遗传多样性水平高低等方面,因此对泥蚶不同地理种群的形态特征和遗传结构差异分析成为开展泥蚶“远距离杂交”的首要任务。

目前,国内外已用形态学标记^[1,12]、同工酶^[13]、线粒体 *CO I*^[14]、RAPD^[15-16]、AFLP^[2,17]等手段对泥蚶不同群体的遗传变异进行了研究,但是利用形态学标记和 SSR 标记相结合的方法来研究泥蚶不同地理种群的遗传变异还未见报道。本试验利用形态学标记和 SSR 分子标记技术研究泥蚶奉化种群和韩国种群间的表型和遗传差异,可望为下一步开展杂交育种实践提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从韩国釜山引进泥蚶种群,从浙江奉化自然海区取本地泥蚶种群,给予同样的养殖环境,同时进行人工繁、养殖。随机选取同批 2 龄泥蚶奉化种群和韩国种群样品,活体带回实验室,用于形态学分析;每个群体随机各取样 30 颗,活体解剖取闭壳肌,无水乙醇固定,置于 -20 ℃ 冰箱中保存,用于基因组 DNA 提取。

SSR 分析所选用的引物来自周小龙等^[18]、顾晓英等^[19]已开发的序列,序列信息见表 1。PCR 反应所用 *Taq* 酶、dNTP、Buffer 等购自 TaKaRa 公司,琼脂糖、聚丙烯酰胺胶等均购自上海生工生物工程有限公司,20 bp marker 购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 形态学数据测量

随机取泥蚶奉化种群样品 118 颗、韩国种群样品 100 颗用于形态学数据测量。用游标卡尺(精度为 0.01 mm)测量

收稿日期:2013-11-12

基金项目:国家现代贝类产业技术体系项目(编号:CARS-48);浙江省宁波市农业择优委托项目(编号:2010C10011);浙江省宁波市海洋与渔业专项资金(编号:种苗工程 34)。

作者简介:姚韩韩(1984—),女,山东菏泽人,硕士,助教,主要从事贝类分子遗传学研究。E-mail:yaohanhan1020@126.com。

通信作者:董迎辉,博士,副研究员,主要从事海洋贝类遗传育种研究。E-mail:dongyinghui118@126.com。

表 1 6 对泥蚶 SSR 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	产物长度 (bp)	重复序列	退火温度 (℃)	GenBank 登录号
ETG29 ^[18]	F:AAAGAAACACAAACACACCG;R:CGAATCGTACCAGGACTAATA	178 ~ 219	(ATAC) ₉	59	KC355398
ETG7 ^[18]	F:TAGAAGTATTTTTTGGCTGG;R:AGTTACAACCTGAAGACCGA	148 ~ 184	(TGA) ₉	59	KC355377
ETG4 ^[18]	F:GCTTCTGGGCAAACCTCT;R:ATTCTGATTTACACCTGG	260 ~ 297	(TG) ₈	56	KC355374
GTG2 ^[18]	F:GCAAGTCGTTCTCATCAA;R:GTATCAGCACCAGGCAAT	254 ~ 289	(AC) ₁₁ ...(CT) ₄ (CA) ₈	59	KC355400
TMP3 ^[19]	F:GACAAGACGAAGTTAGCAAG;R:GAAACGGATAGAATAATCAAAGA	137 ~ 197	(GAA) ₁₃	59	EU881987
TMP18 ^[19]	F:AGTTACAGTTGGTGCTCTTTTCA	141 ~ 201	(TTTC) ₆ (ATC) ₄	59	EU881990
	R:GACAGCCTCGATGTAAGTTAAA	141 ~ 201	GTC(TTC) ₁₁	59	EU881990

泥蚶的壳长(SL)、壳高(SH)、壳宽(SW)、壳顶宽(SRW)。用滤纸吸干贝壳表面水分,电子天平(精度为 0.01 g)称量总质量(TW)。活体解剖后,用滤纸吸除表面水分和血液,电子天平称量软体部质量(IW)。为消除个体差异的影响,以各性状的相对比值作为形态分析的指标,考察 SH/SL、SW/SL、SRW/SL、IW/TW 4 个形态特征指标。

1.3 DNA 提取和 SSR 分析

1.3.1 基因组 DNA 的提取 取泥蚶闭壳肌,采用常规酚-氯仿法提取基因组 DNA。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 的完整性检测,微量紫外分光光度计(GE Nano Value)测定 DNA 的浓度和纯度,调整至终浓度 100 ng/μL,用于 SSR 分析。

1.3.2 SSR 分析 选取 6 个高度多态性的泥蚶 SSR 位点用于 2 个种群遗传差异分析。PCR 反应体系为:1 × PCR Buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 μmol/L 上下游引物, 100 ng DNA 模板, 0.5 U TaKaRa rTaq 聚合酶,补足水至 20 μL。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s, 退火(温度根据各个引物而异)45 s, 35 个循环;72 ℃ 延伸 45 s;最后 72 ℃ 延伸 7 min;4 ℃ 保存。PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,180 V 恒电压电泳 3 h, EB 染色, Bio-rad Gel Doc XRS + 紫外光下拍照,根据图谱结果统计各群体的基因型。

1.4 数据处理与分析

2 个种群各形态指标差异用 SPSS 16.0 软件进行 ANOVA 单因素方差分析,并进行了 Tukey 多重比较检验, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异。

根据图谱基因型统计结果,用 POPGENE 1.31 计算 6 个微卫星微点在 2 个种群的等位基因数(N_a)、有效等为基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、2 个群体的遗传距离(D)和遗传相似度(I);使用 Cervus 3.0 计算多肽信息含量(PIC);使用生物在线软件 GENEPOP 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au>)进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,并用 Bonferonni correction 对结果进行校正。

2 结果与分析

2.1 形态学数据分析

对泥蚶 2 个地理种群间形态指标差异进行了 ANOVA 分析和 Tukey 多重比较,结果(表 2、表 3)显示,SH/SL、SW/SL、SRW/SL、IW/TW 这 4 个形态学参数在 2 个种群间均表现出极显著差异($P < 0.01$)。韩国种群的 SW/SL、SRW/SL 2 个形态指标均极显著高于奉化种群($P < 0.01$),表明韩国种群的壳型比奉化种群更加鼓胀;韩国种群的 IW/TW 极显著高于奉化种群,表明韩国种群的可食用的软体部含量高,即出肉率高,与奉化种群相比表现出一定的生长优势。

表 2 泥蚶奉化种群与韩国种群 5 个形态指标的多重比较(Tukey 法)

种群	样本容量	2 个种群形态差异			
		SH/SL	SW/SL	SRW/SL	IW/TW
奉化种群	118	0.809 2 ± 0.025 3	0.706 0 ± 0.033 7	0.076 9 ± 0.020 6	0.209 4 ± 0.054 2
韩国种群	100	0.789 3 ± 0.262 0	0.729 8 ± 0.033 6	0.103 1 ± 0.028 4	0.267 8 ± 0.052 5

表 3 泥蚶奉化种群与韩国种群 5 个形态指标的的方差分析

方差来源	df	SH/SL		SW/SL		SRW/SL		IW/TW	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
种群间	1	0.022	32.494 **	0.031	26.965 **	0.037	61.794 **	0.115	49.141 **
种群内	216	0.001		0.001		0.001		0.002	
总变异	217								

注: $F_{0.05}(1, 216) = 3.89$; $F_{0.01}(1, 216) = 6.76$ 。

2.2 6 对 SSR 引物在泥蚶 2 个种群中的扩增结果

利用 6 对多态的 SSR 引物对泥蚶奉化种群和韩国种群共 60 个个体进行了 PCR 扩增和电泳检测,结果见表 4。6 对 SSR 引物共检测到 64 个等位基因,每个位点产生的等位基因数在 3 ~ 16 个之间,平均每个位点产生 10.67 个等位基因。6

个 SSR 位点的 PIC 值介于 0.328 ~ 0.890,其中 5 个位点的 PIC 值 > 0.5 ,表现出高度多态性,可用于种群间的遗传差异分析。

2.3 泥蚶奉化种群和韩国种群的遗传变异分析

泥蚶奉化种群和韩国种群的等位基因数(N_a)、观测杂合

表 4 6 对 SSR 引物在泥蚶 2 个群体中的扩增结果

位点	N_a (个)	H_o	H_e	PIC
ETG4	3	0.417	0.377	0.328
ETG7	12	0.567	0.829	0.802
ETG29	9	0.417	0.688	0.647
GTG2	13	0.433	0.853	0.828
TMP3	16	0.900	0.906	0.890
TMP18	11	0.421	0.904	0.887
平均值	10.67	0.525 8	0.759 5	0.730 4

度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、多态信息含量 (PIC) 及 Hardy - Weinberg 平衡检验结果见表 5。遗传多样性分析表明,奉化种群和韩国种群在等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、 PIC 值等遗传参数上差异很小。奉化种群平均等位基因数为 9.00,韩国种群的平均等位基因数为 9.17 个。泥蚶

表 5 6 对 SSR 引物在泥蚶两群体中的遗传多样性及 Hardy - Weinberg 平衡检验

位点 (个)	奉化种群				韩国种群			
	N_a	H_o	H_e	PIC	N_a	H_o	H_e	PIC
ETG4	3	0.300	0.337	0.294	3	0.533	0.420	0.359
ETG7	11	0.733	0.834 *	0.798	7	0.400	0.765 *	0.713
ETG29	8	0.500	0.745 *	0.697	8	0.333	0.621 *	0.576
GTG2	9	0.367	0.812 *	0.770	12	0.500	0.881 *	0.852
TMP3	14	1.000	0.909	0.885	14	0.800	0.862	0.831
TMP18	9	0.267	0.895 *	0.868	11	0.593	0.907 *	0.880
平均值	9	0.527 8	0.755 5	0.718 8	9.17	0.526 5	0.742 5	0.701 9

注: N_a 表示等位基因, H_o 表示观测杂合度, H_e 表示期望杂合度, PIC 表示多态信息含量,* 表示显著偏离 Hardy - Weinberg 平衡 ($P < 0.05$)。

表 6 泥蚶群体间遗传相似性系数和相对遗传距离

群体	奉化种群	韩国种群
奉化种群	****	0.872 2
韩国种群	0.136 7	****

注:对角线上方为群体间遗传相似性系数,下方为相对遗传距离; $F_{st} = 0.022$ 。

3 讨论

随着生物技术的发展,评价生物遗传变异的方法也逐步更新,如形态学标记、生化标记、分子标记等。形态学标记即肉眼可见的或仪器可测量的特定生物外部形态特征,如生物体的形态性状、生理性状、杂交特性等表型特征,是最早被使用的一类遗传标记^[20]。形态特征是生物品种鉴定和分类的重要依据,具有直观、简便等优点,广泛应用于海洋经济贝类研究中,如以贝类“壳色”这一重要形态性状为研究对象,培育出“蓬莱红”栉孔扇贝^[21]、“中科红”海湾扇贝^[22]等。关于泥蚶形态学标记的研究,国内已有相关报道,如张永普等利用多变量形态度量学方法对我国山东、浙江、广西和韩国 4 个地理种群的泥蚶形态变异进行了比较研究,分别测定了不同群体的壳长、壳高、壳顶宽等 9 个形态参数,结果表明泥蚶贝壳性状(壳宽和壳高)是决定泥蚶不同地理种群的主要性状^[1];蒋涛涛等定量分析了泥蚶壳形态性状对活体质量和软体部质量的影响,分别测量了壳长、壳宽、壳高、活体质量和软体部质量等数据,发现壳宽和壳高是影响泥蚶活体质量、软体部质量

奉化种群和韩国种群的平均观测杂合度分别为 0.527 8 和 0.526 5,平均期望杂合度均高于平均观测杂合度,分别为 0.755 5 和 0.742 5。6 个微卫星位点在奉化种群的平均 PIC 值为 0.718 8,稍高于韩国种群 ($PIC = 0.701 9$)。Hardy - Weinberg 平衡检验结果表明,除位点 ETG4 和 TMP3 在 2 个种群中未偏离平衡外,其余位点都显著偏离了 Hardy - Weinberg 平衡。

由 POPGENE 1.31 软件计算出泥蚶 2 个种群的遗传距离和遗传分化系数(表 6)。结果表明,奉化种群和韩国种群的遗传分化系数 F_{st} 为 0.022,表明经过长时间的地理隔离,2 个种群的遗传变异不大;但 2 个种群的遗传距离为 0.136 7,特别是在 GTG2、TMP18、ETG7 等位点中 2 个种群的等位基因数和期望杂合度等参数存在显著差异,表明 2 个种群的遗传结构已经发生了一定程度的变异。

的主要因素,为泥蚶选择育种提供了理论依据和理想的测度指标^[12]。在前人的研究基础之上,本试验利用形态学标记来研究泥蚶韩国种群和奉化种群的形态差异,发现韩国种群的壳型比奉化种群更加鼓胀,且韩国种群的软体部含量相对较高,即出肉率高,说明韩国种群较奉化种群表现出一定的生长优势。

然而形态学标记也具有一定的局限性,因为生物的形态及表型性状是遗传因素和环境因素相互作用的结果,只研究表型变异不能完全或真实地反映遗传变异^[20],因此须与其他手段相结合来更真实地反映种群间的遗传差异。随着分子生物学的快速发展,分子标记技术已广泛地应用于种群间遗传多样性分析。分子标记是利用分子生物学方法来区分不同的种群或个体,是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,是 DNA 水平遗传多态性的直接反映,与形态学标记相比,具有不易受环境或其他因素影响、多态性高、分辨率高等优点^[23]。截至目前,已相继出现了 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等分子标记技术。利用分子标记技术研究泥蚶种群遗传多样性的研究,国内外已有相关报道,如李太武等^[15]、徐义平等^[16]用 RAPD 技术研究了泥蚶不同地理种群的遗传多样性;郑文娟等^[14]利用线粒体 *CO I* 基因测序技术评价了我国沿海 7 个泥蚶地理群体的遗传分化;姚韩韩等^[2]、董迎辉等^[17]利用 AFLP 技术对泥蚶不同选育群体进行了遗传变异分析;而利用 SSR 分子标记技术来研究泥蚶不同种群间的遗传差异,国内外还未见报道。与前述几种分子标记相比,SSR

标记具有数量丰富、共显性、多态性高等优点^[24]。为了更深入地研究泥蚶韩国种群和奉化种群间的遗传差异,本研究选用 6 对高度多态的 SSR 引物对这 2 个种群的遗传多样性进行评价,结果表明韩国种群和奉化种群都具有较高的遗传多样性(PIC>0.5),种质资源处于良好、稳定状态。从各项遗传参数来看,奉化种群的遗传多样性要稍高于韩国种群,这有可能与韩国种群的引种有关,即引进的韩国泥蚶种群有可能对我国的养殖环境不适应,造成遗传多样性有所降低。这 2 个种群的遗传距离为 0.1367,特别在 GTG2、TMP18、ETG7 等位点中这 2 个种群的等位基因数和期望杂合度等参数存在显著差异,表明这 2 个种群的遗传结构仍存在一定程度的变异。

利用形态学标记和 SSR 分子标记技术相结合的方法来研究泥蚶奉化种群和韩国种群的遗传变异,对下一步泥蚶优良品种选育具有一定的指导意义。根据韩国种群具有壳型鼓胀、出肉率高等优点,奉化种群遗传多样性稍高且适应环境能力强等优势,可充分利用这 2 个种群的优势,进行泥蚶韩国种群和奉化种群的杂交选育,以期培育出出肉率高、适应环境能力强的泥蚶优良品种。

参考文献:

- [1] 张永普,林志华,应雪萍. 不同地理种群泥蚶的形态差异与判别分析[J]. 水产学报,2004,28(3):339-342.
- [2] 姚韩韩,董迎辉,林志华,等. 泥蚶 4 个快速生长家系的遗传变异分析[J]. 水产学报,2011,35(3):350-357.
- [3] 燕敬平,孙慧玲,方建光,等. 日本盘鲍与皱纹盘鲍杂交育种技术研究[J]. 海洋水产研究,1999,20(1):35-39.
- [4] 董迎辉,林志华,柴学良,等. 文蛤山东种群与江苏种群杂交及自繁子代的遗传差异分析[J]. 水产学报,2009,33(4):557-564.
- [5] Hedgecock D, Davis J P. Improving pacific oyster brood stock through crossbreeding[J]. Journal of Shellfish Research, 2000, 19: 614-615.
- [6] 刘晓林,常亚青,相建海,等. 栉孔扇贝中国种群和日本种群杂交一代的早期生长发育[J]. 水产学报,2002,26(5):385-390.
- [7] 刘晓林,常亚青,相建海,等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的初步研究——I. 中国种群与俄罗斯种群的杂交[J]. 海洋学报, 2003,25(1):93-99.
- [8] 张国范,王继红,赵洪恩,等. 皱纹盘鲍中国群体和日本群体的自交与杂交 F₁ 的 RAPD 标记[J]. 海洋与湖沼,2002,33(5):

484-491.

- [9] 肖国强,林志华,董迎辉,等. 文蛤不同地理群体自繁和互交 F₁ 代的早期生长性状[J]. 水产学报,2010,34(2):255-263.
- [10] 王爱民,丁小雷,邓凤姣,等. 马氏珠母贝大亚湾和三亚野生种群内自繁及种群间杂交一代的 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究, 2003,24(4):19-25.
- [11] 李家乐,董志国,郑汉丰. 三角帆蚌三种群 F₁ 遗传差异的 RAPD 分析[J]. 水产学报,2007,31(6):848-852.
- [12] 蒋涛涛,施育彦,姚韩韩,等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)壳形态性状对活体重和软体部重的影响效果分析[J]. 江苏农业科学, 2013,41(5):200-202.
- [13] 吕振明,李太武,苏秀榕. 泥蚶遗传多样性的研究[J]. 高技术通讯,2005,15(12):104-110.
- [14] 郑文娟,朱世华,沈锡权,等. 基于线粒体 *CO I* 基因序列探讨泥蚶的遗传分化[J]. 动物学研究,2009,30(1):17-23.
- [15] 李太武,李成华,宋林生,等. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性,2003,11(2):118-124.
- [16] 徐义平,孙开练,杨桂梅,等. 温州乐清湾三个泥蚶群体遗传多样性的初步研究[J]. 上海水产大学学报,2006,15(2):234-238.
- [17] 董迎辉,姚韩韩,林志华,等. 泥蚶生长性状相关 AFLP 分子标记的筛选[J]. 水产学报,2012,36(6):825-831.
- [18] 周小龙,董迎辉,林志华,等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)基因组 SSR 和 EST-SSR 的开发及比较研究[J]. 海洋与湖沼,2013,44(2):467-475.
- [19] 顾晓英,曾庆国,尤仲杰,等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)6 个微卫星引物的分离和鉴定[J]. 海洋与湖沼,2008,39(6):661-664.
- [20] 朱东丽,林志华,董迎辉,等. 文蛤遗传标记研究进展[J]. 海洋科学,2009,33(10):119-123.
- [21] 包振民,陈刚,胡景杰,等. 高产抗逆杂交扇贝品种的育成方法:中国,CN1895037A[P]. 2007-01-07.
- [22] 张国范,刘述锡,刘晓,等. 海湾扇贝自交家系和自交效应[J]. 中国水产科学,2003,10(6):441-445.
- [23] 孙效文,鲁翠云,贾智英,等. 水产动物分子育种研究进展[J]. 中国水产科学,2009,15(6):981-990.
- [24] 董迎辉,姚韩韩,边平江,等. 泥蚶 34 个 EST-SSR 标记的开发及在格粗饰蚶中的通用性检测[J]. 水产学报,2013,37(1):70-73.