

文章编号: 1004-7271(2007)01-0001-06

缙蛭六群体 16S rRNA 基因片段序列的差异分析

牛东红, 李家乐, 汪桂玲, 姜志勇, 张文博, 沈玉帮, 冯冰冰

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用 PCR 技术扩增了缙蛭线粒体 DNA 的 16S rRNA 基因片段, PCR 产物经纯化、测序、同源序列比对获得长度为 440 bp 的核苷酸序列。利用 16S rRNA 基因片段分析了江浙沪地区三个野生群体(江苏射阳、上海崇明、浙江象山)和三个养殖群体(江苏射阳、上海奉贤、浙江象山)的遗传多样性, 共检测到了 19 个单倍型和 41 个核苷酸多态位点。序列分析结果显示, 三个野生群体之间出现了明显的遗传分化, 其中崇明群体遗传多样性最高, 其次为射阳群体, 象山群体遗传多样性最低, 表明崇明群体未受到养殖群体基因的污染。在养殖群体之间则没有达到遗传分化, 且单倍型混杂, 聚类结果显示与象山野生群体亲缘关系最近, 这表明长期的养殖过程在一定程度上对野生群体产生了影响, 降低了种质资源的丰富度。

关键词:缙蛭; 线粒体 DNA; 16S rRNA; 遗传多样性

中图分类号: S 917 文献标识码: A

The genetic diversity of mitochondrial 16S rRNA gene fragment in six populations of *Sinonovacula constricta*

NIU Dong-hong, LI Jia-le, WANG Gui-ling, JIANG Zhi-yong,
ZHANG Wen-bo, SHEN Yu-bang, FENG Bing-bing

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Mitochondrial 16S rRNA gene fragment of *Sinonovacula constricta* was amplified with polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were purified and sequenced from three wild populations: She-yang (WS), Chong-ming (WC), Xiang-shan (WX) and three cultured populations She-yang (CS), Feng-xian (CF), Xiang-Shan (CX) in Jiangsu, Zhejiang and Shanghai. 440 base-pair nucleotide sequences of 16S rRNA were examined and analyzed for genetic polymorphism. Sequences data analysis showed that all 47 sequences were grouped into 19 haplotypes and there were 41 variable nucleotide positions in 16S rRNA gene fragments. The genetic diversity indexes were calculated and the results indicate that the significant genetic difference was observed among three wild populations, WC population has more variation than others, followed by WS population, WX population has the least sequence variation, which suggests that WC population has not been polluted by cultured populations. But there is no genetic difference among three cultured populations and it is closest to WX population. So the culturing process has reduced wild genetic diversity.

Key words: *Sinonovacula constricta*; mtDNA; 16S rRNA; genetic diversity

收稿日期: 2006-10-08

基金项目: 上海市重点学科建设项目资助(Y1101)

作者简介: 牛东红(1978-), 女, 河北张家口人, 博士研究生, 专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。

通讯作者: 李家乐, E-mail: jili@shfu.edu.cn

缢蛏 (*Sinonovacula constricta* Lamarck) 俗称蛏子、泥蛏、蜻, 属瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、真瓣鳃目 (Eulamellibranchia), 竹蛏科 (Solenidae), 缢蛏属 (*Sinonovacula*), 为广温广盐性海产双壳类, 是我国四大养殖贝类之一。目前缢蛏养殖业发展迅速, 异地引种日益频繁, 再加之海洋环境的恶化, 容易导致野生种质资源的减少和种质退化, 因此加强缢蛏种质资源的遗传多样性研究是合理开发资源, 促进资源可持续性利用的重要前提之一。对缢蛏的群体遗传多样性研究此前曾有过相关报道, 主要是采用同工酶电泳技术^[1,2]和 RAPD 技术^[3,4]。由于同工酶和 RAPD 技术的局限性, 因此需要其他技术对种群遗传特征进行更加全面的研究。随着分子生物学技术的迅速发展, DNA 分子的多态性研究开始受到人们的普遍重视, 而线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 由于具有分子量小、结构简单、进化速度快、母性遗传等特点, 成为生物多样性、群体遗传学和系统进化研究中的重要参考对象^[5,6], 并在扇贝、牡蛎等海洋贝类遗传多样性研究中得到了很好的应用^[7,8], 但在缢蛏群体遗传多样性检测中还未见相关报道。本文根据线粒体 16S rRNA 基因片段的多态性来揭示江浙沪地区缢蛏群体的遗传多样性, 以期为缢蛏分子水平的群体遗传结构研究奠定基础, 为缢蛏种质资源的保护和利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2006年8月, 在江苏省射阳县射阳湖港口采集缢蛏野生群体 (WS) 和养殖群体 (CS), 在浙江省象山县高唐镇采集缢蛏野生群体 (WX) 和养殖群体 (CX), 在上海市郊崇明县陈家镇采集野生缢蛏群体 (WC), 奉贤区采集养殖缢蛏群体 (CF)。在采集地或带回实验室活体解剖, 将其外套膜组织用无水乙醇固定, 备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

每个缢蛏群体随机选取 7~8 个样本, 每个样本取 0.5 g 外套膜组织剪碎后, 加入 500 μ L 组织匀浆缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, PH=8.0; 50 mmol/L EDTA, PH=8.0), 混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200 μ g/mL 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 裂解澄清。采用苯酚-氯仿的抽提方法提取基因组 DNA。紫外分光光度计测定样品 DNA 的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值, 确定其浓度和纯度, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 反应

16S rRNA 序列的扩增引物: 16SAR: 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3', 16SBR: 5' CCG GTT GAA CTC AGA TCA 3'^[9], 由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 进行 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应体系为 25 μ L, 含 10 \times Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L, 模板 DNA 50-100 ng。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测, EB 染色, 于凝胶成像系统下观察并拍照记录。

1.2.3 扩增产物的纯化和测序

PCR 产物的纯化和测序工作由国家人类基因组南方研究中心完成。

1.2.4 序列分析

利用 Bioedit 7.0 软件进行序列的编辑、排序、比对, DNASP 4.10 软件计算遗传多样性参数, MEGA 3.1 软件计算遗传距离和聚类分析。

2 结果

2.1 缢蛏群体 16S rRNA 基因部分序列碱基组成

经 PCR 扩增, 均得到了特异性很好的 16S rRNA 基因片段扩增产物 (图 1)。序列测定表明, 16S rRNA 序列长度大约 500 bp, 通过 BLAST 分析比较确认所得片段为 16S rRNA 基因片段。经 Clustal

W 同源排序,除去引物和部分端序列得到了长度为 440 bp 的 16S rRNA 序列。

利用 MEGA3.1 软件计算缙蛭群体 16S rRNA 序列碱基(T、C、A、G、A + T)组成(表 1),结果表明除崇明群体外,其它群体碱基组成差异不大,其中 16S rRNA 基因序列 T、C、A、G 和 A + T 的平均含量分别为 31.5%、13.7%、32.0%、13.0%、63.4%, A + T 含量显著高于 G + C 含量。

2.2 缙蛭群体遗传多样性分析

利用 DNASP4.10 计算群体遗传多样性参数,结果见表 2:

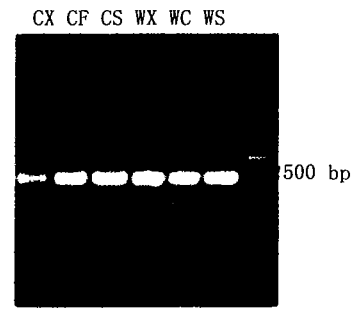


图 1 由引物 16SAR 和 16SBR 扩增出的 mtDNA 16S rRNA 基因片段

Fig. 1 mtDNA 16S rRNA gene fragment of *S. constricta* amplified by primer 16SAR and 16SBR

表 1 缙蛭群体 16S rRNA 基因片段的碱基组成

Tab. 1 Base compositions of 16S rRNA gene fragments of *S. constricta* populations (%)

群体	个体数	T	C	A	G	A + T
WS	8	31.7	13.5	31.8	22.9	63.5
WC	8	32.2	13.2	32.6	22.0	64.8
WX	7	31.3	13.7	31.8	23.2	63.1
CS	8	31.2	13.8	31.8	23.3	63.0
CF	8	31.2	13.8	31.8	23.2	63.0
CX	8	31.2	13.9	31.7	23.1	62.9
Ave.	47	31.5	13.7	32.0	13.0	63.4

表 2 缙蛭群体 16S rRNA 基因片段遗传多样性参数

Tab. 2 Genetic diversity parameters of 16S rRNA gene fragments among *S. constricta* populations

群体	个体数	单倍型数 (NHap)	单倍型多态性 (Hd)	多态位点数 (S)	简约信息位点数 (Pi)	平均核苷酸差异数 (k)	核苷酸多样性指数 (P)
WS	8	4	0.821	4	3	1.821	0.004 15
WC	8	3	0.464	10	0	2.500	0.005 68
WX	7	4	0.714	4	0	1.143	0.002 60
CS	8	4	0.714	4	0	1.143	0.002 60
CF	8	4	0.643	3	2	1.107	0.002 52
CX	8	5	0.857	4	1	1.286	0.002 93
ToTal	47	19	0.878	41	24	8.272	0.018 89

根据 16S rRNA 基因序列计算遗传多样性参数,在 47 个缙蛭个体中,共检测到了 19 个单倍型,且野生射阳群体和崇明群体具有各自的单倍型,41 个核苷酸多态位点,包括 2 个插入/缺失突变位点,15 个单一变异位点(Singleton variable sites),24 个简约信息位点(Parsimony informative sites),其中发生转换突变的核苷酸位点数为 27 个(T/C, A/G),颠换突变为 12 个(A/T),转换与颠换之比达 2.25,平均核苷酸差异数为 8.272,核苷酸多样性指数为 0.018 89。结果显示野生崇明群体的核苷酸多态位点数,平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数均最高,野生象山群体遗传多样性参数较低,养殖群体遗传多样性较低,且群体内部没有显著差异。

2.3 缙蛭群体遗传距离和聚类分析

利用 MEGA3.1 软件中的 Kumara 双参数模型(转换 + 颠换)计算缙蛭群体的相对遗传距离(表 3)。

表 3 基于 16S rRNA 基因片段的缢蛭群体相对遗传距离
Tab.3 Genetic distance of 16S rRNA gene fragments among *S. constricta* populations

	WS	WC	WX	CS	CF	CX
WS						
WC	0.047					
WX	0.017	0.051				
CS	0.017	0.051	0.003			
CF	0.016	0.050	0.003	0.003		
CX	0.017	0.052	0.003	0.003	0.003	

基于 16S rRNA 基因片段的缢蛭群体相对遗传距离在 0.003 ~ 0.047 之间,其中野生崇明群体与其它群体之间的遗传距离最远,达到了遗传分化,野生象山群体和养殖各群体之间的遗传距离最近均为 0.003,没有达到遗传分化。

以大竹蛭(*Solen grandis*)为外群,对缢蛭六群体构建 NJ 树(图 2),进化树各分支的置信度由 Bootstrap1000 循环检验。聚类结果显示野生群体各聚为一类,其中象山群体和盐城群体首先聚为一类,然后与崇明群体聚在一起。养殖群体和象山野生群体聚在一起,且各养殖群体之间没有清晰的聚类现象。

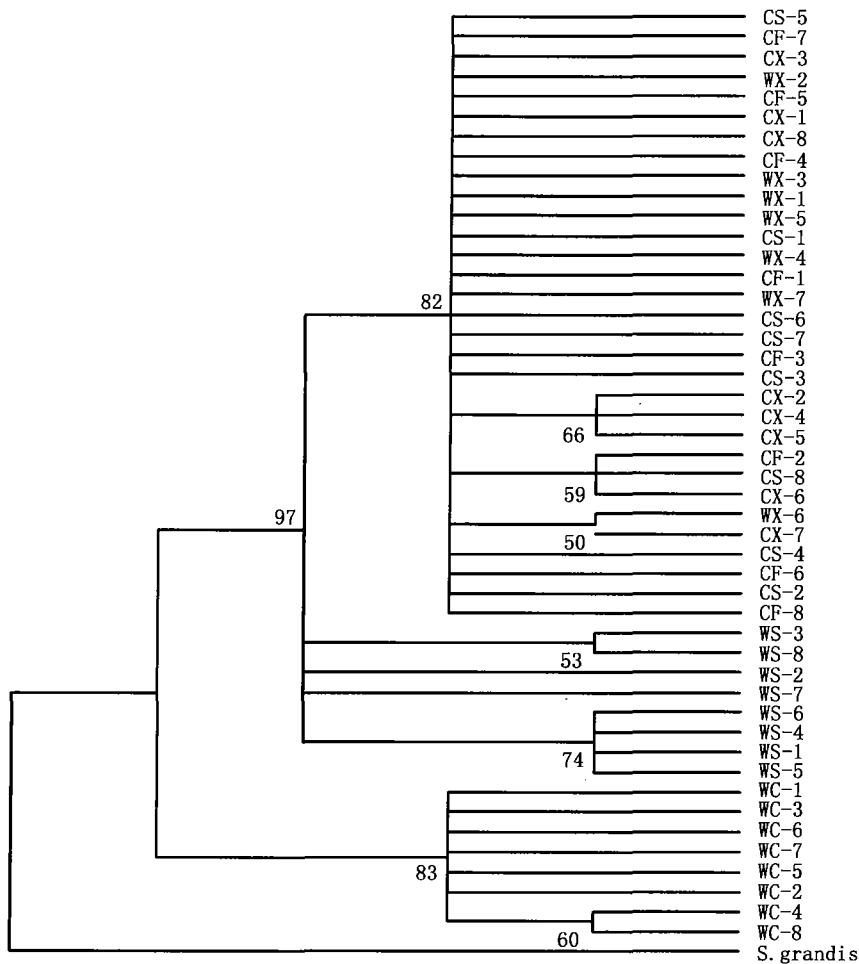


图 2 基于 16S rRNA 基因缢蛭群体的 NJ 系统树

Fig.2 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA of six *S. constricta* populations

3 讨论

线粒体 DNA 基因序列差异在种内遗传多样性和种间系统学关系的研究中占有重要的地位^[10,11],其中 16S rRNA 在群体遗传多样性研究中已经得到了广泛应用。例如,在虾夷扇贝^[12] (*Patinopecten yessoensis*) 和栉孔扇贝^[7] (*Chlamys farreri*) 群体的 16S rRNA 基因序列检测到了丰富的核苷酸变异位点,在近江牡蛎^[8] (*Crassostrea rivularis*) 四个群体的 16S rRNA 核苷酸序列中也检测到 23 个多态性核苷酸突变位点和 12 种单倍型,对曼氏无针乌贼^[13] (*Sepiella maindroni*) 群体遗传结构进行分析时还发现了区分中国东南海域和日本海域的 16S rRNA 基因片段序列分子标记。此外,在对美菲对虾 (*Penaeus notialis*) 和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 群体的 16S rRNA 基因片段序列进行研究时,同样发现了丰富的核苷酸多态性^[14,15]。本文在六个缢蛏群体共 47 个个体的 16S rRNA 基因片段中共发现了 41 个多态位点和 19 个单倍型,表明 16S rRNA 核苷酸序列在缢蛏群体中具有相对较快的进化速率。可见根据 16S rRNA 核苷酸序列变异可以分析缢蛏种群的遗传多样性。

基于 16S rRNA 序列分析发现,不同地理群体缢蛏遗传多样性参数具有一定差异,其中上海崇明野生群体的多态性最高,其次为江苏射阳野生群体,最后为象山野生群体及养殖各群体。同时聚类结果显示崇明野生群体与其他各群体的遗传距离最远,其次为射阳野生群体,象山野生群体与养殖各群体遗传距离最近只有 0.003,而根据 Thorp^[16] 提出种群间的遗传距离是 0.030 ~ 0.200,说明只有崇明野生群体达到了显著的遗传分化,成为独立的种群,其它群体没有达到遗传分化。到目前为止,崇明尚未开展缢蛏的人工增养殖,该地区的缢蛏还处于纯野生状态,由于没有受到养殖缢蛏群体的干扰,所以保持有丰富的遗传多样性,遗传分化程度最高,从长期效益考虑建议对其加强保护,以保证缢蛏种质资源的可持续利用。

浙江省缢蛏养殖历史悠久,象山又是蛏苗的主要产区之一,再加之引种频繁,导致象山野生群体种质资源受到了严重的影响。从群体遗传多样性参数及遗传距离值不难发现,养殖过程会导致群体内部基因杂合度下降,同质化程度加剧,适合度下降^[17]。正是由于在象山缢蛏养殖规模逐渐扩大,养殖群体数量不断增加,缩小了野生群体的占有面积,从而导致野生群体数量下降,近亲交配机率增加,遗传多样性降低,抗逆能力减弱等一系列种质退化“后遗症”的发生。因此在缢蛏增养殖过程中要合理选用亲本,正确选择引种地点。在今后缢蛏遗传改良工程中,可以把遗传多样性最丰富、遗传分化程度最高的崇明野生群体作为育种材料,并对其养殖性能做进一步的研究,选择合适的育种策略,从而合理利用缢蛏种质资源。

参考文献:

- [1] 王冬群,李太武,苏秀榕. 象山缢蛏养殖群体和野生群体遗传多样性的比较[J]. 中国水产科学, 2005, 12 (2): 138 - 143.
- [2] 王冬群,李太武,苏秀榕. 缢蛏六个种群的生化遗传标记[J]. 水产科学, 2004, 23(4): 8 - 11.
- [3] 李成华,李太武,宋林生,等. 4 个缢蛏群体遗传结构的 RAPD 分析[J]. 水产科学, 2004, 23(12): 26 - 28.
- [4] 李成华,李太武,苏秀榕,等. 宁波长街缢蛏遗传结构的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2004, 28(10): 48 - 51.
- [5] Suneetha K B, Dagle G, Nevdal G. Analysis of mitochondrial DNA sequence from two Maurolicus taxa: evidence for separate species [J]. Journal of Fisheries Biology, 2000, 57: 1605 - 1609.
- [6] Canapa A, Barucca M, Marinelli A, et al. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca : Bivalvia) [J]. Journal of Molecular Evolution, 2000, 50: 93 - 97.
- [7] 刘亚军,喻子牛,姜艳艳,等. 栉孔扇贝 16SrRNA 基因片段序列的多态性研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 477 - 483.
- [8] 苏天凤,江世贵,周发林,等. 近江牡蛎 16S rRNA 基因片段序列变异分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(2): 100 - 103.
- [9] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca : Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 15 (2): 191 - 214.
- [10] Kappner I, Bieler R. Phylogeny of *venus clams* (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 40: 317 - 331.
- [11] Cannas R, Caul A, Deiana A M, et al. Discrimination between the Mediterranean spiny lobsters *Palinurus elephas* and *P. mauritanicus*

- (Crustacea: Decapoda) by mitochondrial sequence analysis[J]. *Hydrobiologia*, 2006, 557:1-4.
- [12] Boulding E G, Boom J, Beekenbaeh A T. Genetic variation in one bottlenecked and two wild populations of scallops: parameter estimates from coding regions of mtDNA[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1993, 50:1147-1157.
- [13] Zheng X D, Wang R C, Xiao S, *et al.* Genetic diversity in Population of *Septiella maindroni* Using 16SrRNA Gene Sequence Analysis [J]. *High Technology Letters*, 2003, 9(1):1-4.
- [14] Machado E G, Dennebouy M, Suarez MO, *et al.* Mitochondrial 16S rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure[J]. *Crustaceana*, 1993, 65(3): 279-286.
- [15] 邱高峰, 常林瑞, 徐巧婷, 等. 中国对虾 16S rRNA 基因序列多态性的研究[J]. *动物学研究*, 2000, 21(1):35-40.
- [16] Thorp J P. The molecular dock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1982, 13(1): 139-168.
- [17] Hindar K N. Genetic effects of cultured fish on natural fish population[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48: 945-957.

喜讯:《上海水产大学学报》荣获首届中国高校优秀科技期刊奖

11月20-26日,在江西南昌召开的中国高等学校自然科学学报研究会五届三次理事会上,《上海水产大学学报》荣获教育部科学技术司颁发的“首届中国高校优秀科技期刊奖”证书。参加本次评选的有部委属院校主办的科技期刊155种,省属本科院校主办的科技期刊177种,高职高专院校主办的科技期刊12种。从中评选出98种优秀科技期刊。经过严格的评选,《上海水产大学学报》获得此项殊荣。

本次优秀科技期刊的评比标准包括政治标准、学术标准和编辑出版标准三个部分。(1)政治标准是:参评期刊办刊方针正确,遵守期刊出版的政策和法规,近3年内未有违规违纪事件发生。(2)质量评比标准:包括总被引频次、相对影响因子、他引总引比、被国内外重要检索系统收录情况、基金论文比、平均引文数、市场占有情况,包括论文下载率和期刊发行量等7个评价指标。(3)编辑出版质量评比标准分为:编辑质量和出版质量。

《上海水产大学学报》编辑部将以此为契机,更新观念,抓住机遇,进一步提高稿源质量、审稿质量和编辑出版质量。同时也感谢广大作者和读者对本刊的关爱,希望大家一如既往地支持编辑部的工作,共同努力把《上海水产大学学报》办得更好。