

栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究*

刘亚军 喻子牛¹⁾ 姜艳艳 张留所 孔晓瑜 宋林生²⁾

(青岛海洋大学教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003)

²⁾(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用 PCR 技术扩增了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) 线粒体 DNA 的 16S rRNA 基因片段, PCR 产物经 T 载体连接之后进行了克隆、测序, 得到 634bp 的核苷酸序列; 分析了该片段的大连、烟台、青岛、朝鲜 4 个自然群体 31 个个体的核苷酸序列多态性, 共检测到 26 个多态性核苷酸位点、18 种单倍型。结果表明, 4 个群体中以朝鲜群体遗传多样性最高, 其次为烟台、青岛群体, 大连群体最低; 不同自然分布区的栉孔扇贝未出现明显的遗传分化。

关键词 栉孔扇贝, 线粒体 DNA, 16S rRNA 基因, DNA 序列测定

中图分类号 Q953

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) 主要分布于我国北方沿海, 以及朝鲜、韩国和日本沿海, 在我国主要分布于山东、辽宁沿海海域, 是我国北方沿海最主要的经济养殖贝类之一。20 世纪 70 年代以来, 栉孔扇贝人工育苗成功, 以及随后人工采苗技术的成熟与完善, 栉孔扇贝海水养殖在我国山东、辽宁两省已形成产业(Guo *et al.*, 1999)。但近年来栉孔扇贝的海水养殖业出现了病害流行、大规模死亡等严重问题。目前, 对于栉孔扇贝大规模死亡的原因尚不清楚, 推测可能有以下原因: 养殖密度过高、近海水域生态系统的不良变化如水质变坏、栉孔扇贝种质一定程度衰退等(王运涛等, 1999; 李红蕾等, 2002)。对此, 非常有必要研究和认识栉孔扇贝各自然群体的遗传结构和遗传变异水平, 为有效地管理、利用和保护栉孔扇贝种质资源和进行优良种质培育提供遗传学依据。

此前, 已有人运用等位基因酶电泳技术对栉孔扇贝的遗传变异进行了研究, 取得了一些非常有用的成果(张国范, 1992²⁾; 陈再忠等, 2001), 并以其结果作为种质遗传评价的重要依据。但由于等位基因酶电泳技术本身的缺陷和不足, 限制了对种群遗传特征的进一步研究。随着分子生物学技术迅速发展, DNA 分子的多态性研究开始受到人们的普遍重视, 其高分辨率、大信息量等优点使之成为遗传、生态和进化等研究领域的重要工具, DNA 序列的变异和多态性为遗传分析提供了更直接、更完全的信息, 现广泛应用在从物种鉴

* 国家重点基础研究发展规划项目(973) 资助, G1999012008 号; 国家自然科学基金资助项目, 39600113 号。刘亚军, 男, 出生于 1976 年 1 月, 硕士研究生, E-mail: liuyajun76@sohu.com

1) 通讯作者, 喻子牛, 男, 出生于 1962 年 10 月, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: carlzyu@ouqi.edu.cn

2) 张国范, 1992. 中国近海栉孔扇贝群体遗传结构及遗传变异与生长的关系。中国科学院海洋研究所博士论文

定、系统学与进化研究到生物种群遗传结构及遗传变异水平等研究领域, PCR 技术和 DNA 测序技术的广泛应用, 使 DNA 序列多态分析成为这些领域的有效手段。线粒体 DNA (mtDNA) 由于具有分子量小、结构简单、表现为母系遗传、进化速度快等特点, 成为动物群体遗传学和系统进化研究中的重要对象(张亚平, 1996; Palumbi *et al.*, 1991; Wilbur *et al.*, 1997; Kitaura *et al.*, 1998; Mulvey *et al.*, 1998; Suneetha *et al.*, 2000; Canapa *et al.*, 2000)。对于选定的基因或基因片段, 可通过互补于高度保守区域的通用引物进行 PCR 扩增, 然后进行分子克隆测序或 PCR 产物直接测序, 对序列数据进行分析。这一方面的工作在哺乳类、鱼类等研究中已有较多报道, 而在海洋贝类研究中较少。文中通过测定栉孔扇贝 mtDNA 16S rRNA 基因片段序列, 分析了栉孔扇贝不同分布区自然群体 16S rRNA 基因序列的多态性, 为进一步展开栉孔扇贝种群的 DNA 多态分析、种质资源保护及遗传标记育种提供了良好的开端, 并可望为栉孔扇贝分子水平的群体遗传结构研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

栉孔扇贝样品于 1997 年 9 月分别采自大连(DL)、烟台(YT)、青岛(QD)、朝鲜(NK), 均为自然群体, 取外套膜和闭壳肌, 于 75% 酒精中 4 °C 冰箱保存。

1.2 总 DNA 提取

随机选取大连、烟台、青岛和朝鲜的栉孔扇贝样品, 其中大连、青岛、朝鲜样品各 8 个, 烟台样品 7 个, 采用常规的酚仿法提取总 DNA, DNA 溶解于 TE 缓冲液, -20 °C 保存备用。

1.3 PCR 扩增

用于 PCR 扩增的引物 16S AR/BR 序列为: 16S AR: 5' GCCTGTTTATCAAA AACAT3'; 16S BR: 5' CCGTCTGAACTCAGATCACGT3'。PCR 扩增在 PTG-100 型 PCR 仪(MJ Research, USA)上进行, 反应体积为 25 μ l, 其中含 2.0mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L 每种 dNTPs, 0.2 μ mol/L 每种引物, 1 μ l DNA 模板, 1 单位 Taq 酶(上海生工), 2.5 μ l 10 \times 缓冲液, 补足灭菌水至终体积。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 2min 后, 94 °C 变性 45s, 50 °C 退火 1min, 72 °C 延伸 1min, 共运行 35 个循环, 最后一个循环结束后 72 °C 再延伸 5min。PCR 产物上样至 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像系统观察、照相。

1.4 PCR 产物分子克隆

PCR 产物用 UNIQ-5(上海生工)柱式纯化试剂盒纯化后, 连接到 pMD18-T 载体(大连宝生物)上。连接反应液总体积 10 μ l, 其中载体 1.0 μ l, Ligation Solution I 5.0 μ l, PCR 产物 4.0 μ l, 其余用水补足; 4 °C 冰箱中过夜连接, 然后将全部连接液转化感受态大肠杆菌 JM109, 涂选择平板, 蓝-白斑筛选阳性克隆, 挑白色单菌落于液体培养基中培养, 提取质粒 DNA, EcoR I 和 Hind III 酶切和 PCR 扩增双重检测克隆片段。

1.5 测序和数据处理

使用 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 及 AmpliTaq DNA polymerase 在 ABI PRISM 377XL DNA 测序仪上双向测序, 利用 Genedoc 软件对序列进行排序, DnaSP 软件分析计算序列多样性参数。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因序列及其多态性

对栉孔扇贝 31 个个体的总 DNA 进行 PCR 扩增, 均获得了特异性很好的 PCR 产物, 经序列测定, 大小相同, 均为 634bp(图 1), 没有发现插入/缺失突变的核苷酸位点。排序后检测到了 26 个多态性核苷酸位点, 共 18 种单倍型; 其中发生转换突变的核苷酸位点数为 24 个, 颠换突变位点 2 个。除了第 309、339、425 位的核苷酸突变位点在 2 个或 2 个以上个体检测到外, 其他多态性核苷酸位点只在某一个体上出现。

```

001 CGCCTGTTTA TCAAAAACAT GGCCTTCTGA AGAACATGGG GGGTCGTGCC TTCCCAGTGG GCATACGAGC CTAACGGAC
081 GCGGTAATC GTGCTAAGGT AGCTAAATTA TGGCCTATTA ATTGTAGTTC CTGTGAATGG TTTGACGAGT CCTCGACTGT
161 CTCGAGGTTG TTTTGGTGAA CTGTGAATTGA ATGTGCAAAAT GCTTTCATGG GAAAGAAAGA CGAGAAGACC CCGTGAAGTT
241 AGAAATTCCT ATTACAGCGT TAATCCGCTT TGATGTTTGT AGATCAGGCG TTTTAGAACT TTAATTTTCC AATACGGCTA
321 GAGTTAGGGG TATTGGATGT TTATAGTTTT TAAGTAGGGG AGTGTGGTTT TGATGAGTIT TGGCTGGGGC AGCAAAGAGG
401 CAAAAC TAGA CCTCTTTAGA CACACAACGG GTGCGTTACG ACCCACAAAA ATGAATTGTG TGATTAGCAG AATGAGTTAC
481 TCCGGGGATA ACAGCGTAAT CTTCCTTGAT AGTTCCTTATA GATGGCCGGG TTTGCGACCT CGATGTTGGC TCTGGGTATC
561 CTGAGGCTTG CAGGCGGTCT CAAGGGTTGG TTCGTTGCC CATTAAAACC TGACGTGATC TGAGTTCAGA CCGG

```

图 1 栉孔扇贝的 16S rRNA 基因片段核苷酸序列(单倍型 A)

Fig. 1 The nucleotide sequence of 16S rRNA gene fragment of *C. farreri* (haplotype A)

在 18 种单倍型中, A、B 两种为所有群体共有, 其他 16 种为各群体特有。除 A、B、C 三种为 2 个个体或 2 个个体以上共有外, 其他单倍型仅为某一个体独有; 在 4 个群体中, 大连群体单倍型最少, 分布范围小, 4 个个体同享单倍型 A, 2 个个体同属单倍型 B, 另外 2 个个体分别为单倍型 C 和 D; 而朝鲜群体和烟台群体单倍型最丰富, 8 个和 7 个个体都分别属于 8 个和 7 个不同的单倍型, 但朝鲜群体拥有更多的多态位点(表 1)。

表 1 16S rDNA 序列多态性核苷酸位点及各单倍型在 31 个栉孔扇贝个体中的分布

Tab. 1 The distribution of variable nucleotides and haplotypes in 16S rDNA fragments of 31 animals of *C. farreri*

单倍型	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
核	28	T	C
苷	31	A	G	.	.	.
酸	43	G	A
变	53	C	T
异	83	G	A	.	.	.
位	102	G	A
点	180	A	G
	185	A	.	.	.	G
	186	A	G
	196	C	T
	267	G	.	T
	280	T	C
	306	T	.	.	.	C

续表

单倍型	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
309	C	T	T
332	A	G	.
339	G	A	.	A
347	T	C
349	T	C
370	T	.	.	.	C
371	T	C
380	T	.	.	C
385	T	.	.	.	G
423	C	T
425	C	T	T	T	.	.
496	G	A	.	.	.
537	A	G
单倍型 DL	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
个体数 YT	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QD	3	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
NK	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Total	9	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

2.2 栉孔扇贝各群体及群体间遗传多样性比较

对各个自然群体的遗传多样性参数及各群体间的相关遗传参数进行计算, 结果见表2和表3。

表2 栉孔扇贝各自然群体的遗传多样性参数比较
Tab. 2 Summary of genetic diversity of different scallop populations

项目	大连(DL)	烟台(YT)	青岛(QD)	朝鲜(NK)	总结(Total)
个体数(n)	8	7	8	8	31
单倍型数(NHap)	4	7	6	8	18
多态位点数(S)	3	8	7	14	26
平均核苷酸差异数(K)	1.036	2.286	1.929	3.500	2.172
核苷酸多样性指数(P_i)	0.00163	0.00361	0.00304	0.00552	0.00343

从表2中可以看出, 由16S rRNA基因片段核苷酸序列反映出来的栉孔扇贝群体遗传多样性水平并不高, 这与已报道的等位基因酶的研究结果较为一致(张国范, 1992¹⁾; 陈再忠, 等, 2001)。在4个群体内相对来看, 以朝鲜群体遗传多样性明显较高, 其次为烟台、青岛群体, 大连群体最低, 如在 S 、 K 和 P_i 这3个指标上, 朝鲜和烟台两群体的值均相

对较高, 青岛群体次之, 大连群体最低(NK > YT > QD > DL); 同时还可以看出: 栉孔扇贝遗传多样性存在以某一纬度为中轴线向两边递减的趋势。以上这些与实际情况是一致的: 朝鲜没有进行栉孔扇贝的育苗和养殖, 因而扇贝资源几乎还没有受到养殖活动的干预, 群体遗传多样性明显维持较高水平; 而我国已进行栉孔扇贝的养殖和人工采苗、育苗多年, 存在同一地区苗种的广泛使用和扩散等问题, 群体遗传多样性明显较低, 进而还存在进苗区(大连、青岛)遗传多样性低于产苗区(烟台)的趋势。上述分析表明, 人工干预可使栉孔扇贝遗传多样性有一定降低, 而这种降低也可能与近几年栉孔扇贝高死亡率有一定关系。

表 3 栉孔扇贝各群体间的遗传差异比较
Tab. 3 Genetic differentiation among Scallop populations

项目	DL-YT	DL-QD	DL-NK	YT-QD	YT-NK	QD-NK
群体间平均核苷酸差异数(K)	1.625	1.531	2.281	2.107	2.821	2.656
群体间平均每位点核苷酸替代数(D_{xy})	0.00256	0.00242	0.00360	0.00332	0.00445	0.00419
群体间每位点净核苷酸替代数(D_a)	-0.00006	0.00008	0.00002	0.00000	-0.00011	-0.00009

从表 3 中可以看出, 朝鲜群体与我国 3 个群体之间的群体间平均核苷酸差异数(K)值均大于我国 3 个群体相互之间的值, 也表明了它与后 3 者有一定差异。4 个群体仅共享 2 个核苷酸多态位点(表 1), 群体间平均每位点核苷酸替代数(D_{xy})与平均核苷酸多样性指数(P_i)相差不是很大, 群体间每位点净核苷酸替代数(D_a)竟然在 3 个群体间出现了负值(DL-YT、YT-NK、QD-NK), YT-QD 间为零。显然, 栉孔扇贝各群体间遗传分化水平比较低。

3 讨论与结论

真核生物基因组只有约 10% 编码蛋白质和酶, 存在约 24% 的同义密码等, 所以等位基因酶电泳检测的遗传变异程度受到一定限制; 而 DNA 序列提供了许多在蛋白质水平难以检测的遗传变异或多态, 如碱基替换、插入和缺失等变异信息, 更可灵敏地分析个体、群体及种间的遗传变异情况。同其他动物 mtDNA 一样, 贝类 mtDNA 亦为闭合环状的双链分子, 结构简单, 具有母系遗传特性和进化速率快等优点, 因此使其在分子水平上对各生物类群的遗传进化研究得到了广泛开展。早期围绕 mtDNA 的研究主要是限制性酶切片段长度多态性(RFLP), 一般认为, 只要选择足够多的酶, 就可以检测到足够的变异, 但相对于 DNA 序列数据来说, 它提供的信息是非常有限的, 不如 DNA 序列数据准确和可靠。PCR 技术的发展使得 mtDNA 基因序列的多态性分析更为简单和方便。mtDNA 上的不同基因提供了不同的解析能力, 如 16S rRNA 基因, Boulding(1993)用此法对虾夷扇贝一个养殖群体和两个野生群体样品进行了分析, 检测到了丰富的遗传变异; Machado 等(1993)对美菲对虾的 16S rRNA 基因片段进行了序列研究, 发现个体间存在较丰富的变异, 且大多是由于碱基的插入或缺失造成; 邱高峰等(2000)用同样方法对中国对虾进行了分析, 也获得了类似结果。

从遗传学角度来看, 一个物种遗传多样性水平的高低与其生存、适应及进化能力是紧密关联的, 遗传多样性的降低将可能导致物种适应性和生活力的降低, 并最终导致物种种

质的衰退。本研究通过对栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究,检测到栉孔扇贝的遗传多样性水平较低,该结果与此前等位基因酶的研究结果基本一致,应该可以基本说明栉孔扇贝群体目前的遗传多样性水平和现状。栉孔扇贝不同于牡蛎,无论养殖贝还是野生贝,其抗逆性都比较弱,容易受海洋环境因子的不良变化的影响。在多年的不良环境因子的胁迫下(野生贝)加上不良养殖方式下如密度过高(养殖贝),以及由此导致的病害易感易发性,会使某些基因型个体逐渐消亡,从而可能导致栉孔扇贝遗传多样性的逐步降低。同时,多年的“养殖贝—释放成‘野生贝’或用作亲贝—产生‘野生苗’或人工繁殖苗”的循环也可能积累了一定的近交衰退效应。反过来,虽然遗传多样性的降低在正常情况下和相对较短时间内不会对种群产生明显影响,但在不良环境因子长年存在时,却很可能使种群适应力降低。因此有观点认为,从栉孔扇贝的其他分布区(如朝鲜)引进亲贝,用它们繁殖后代或与我国亲贝进行杂交、选育,应该是解决栉孔扇贝养殖业所面临问题的办法之一,但进行此工作之前应对引进群体的遗传背景或遗传变异水平进行了解,与我国栉孔扇贝群体的遗传变异情况进行比较,这是种质资源管理和生产实践所必需的。从本研究来看,朝鲜群体遗传变异比我国群体丰富,是与我国群体进行杂交和选育的好材料。

mtDNA 不同区域变异率存在差异,遗传变异解析能力也不同。在本研究中,16S rRNA 基因在个体及种群间变异略小,因此,检测的遗传多样性水平可能略有偏低,要进行较全面的研究,宜应再选择 mtDNA 其他不同的基因区域(如 COI、Cytb 等),得到多组序列数据。另外,还可把线粒体 DNA 序列数据与核基因组多样性数据(如 RAPD)结合起来,在方法上相互补充应用,则能较为客观、全面地反映遗传多样性水平。

参 考 文 献

- 王运涛, 相建海, 1999. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨. 海洋与湖沼, 30(6): 770—774
- 李红蕾, 宋林生, 刘保忠等, 2002. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势. 海洋与湖沼, 33(2): 188—195
- 邱高峰, 常林瑞, 徐巧婷等, 2000. 中国对虾 16S rRNA 基因序列多态性的研究. 动物学研究, 21(1): 35—40
- 张亚平, 1996. 从 DNA 序列到物种树. 动物学研究, 17(3): 247—252
- 陈再忠, 喻子牛, 孔晓瑜, 2001. 栉孔扇贝三个自然群体遗传变异初步研究. 见: 中国贝类学会编. 中国贝类学论文集 (IX). 北京: 海洋出版社, 54—58
- Boulding E G, 1993. Genetic variation in bottlenecked and two wild populations of the Japanese scallop (*Patinopaxen yessoensis*): empirical parameter estimates from coding regions of mitochondrial DNA. Can J Fish Aquat Sci, 50: 1147—1157
- Canapa A, Banucca M, Marinelli A *et al.*, 2000. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). J Mol Evol, 50: 93—97
- Guo X M, Ford S E, Zhang F S, 1999. Molluscan aquaculture in China. J Shell Res, 18(1): 19—31
- Kitaura J, Yamamoto G, Nishida M, 1998. Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis. Fisheries Science, 64(4): 538—542
- Machado E G, Dennebouy M, Suarez M O *et al.*, 1993. Mitochondrial 16S rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure. Crustaceana, 65(3): 279—286
- Mulvey M, Liu H P, Kandl K, 1998. Application of molecular genetic markers to conservation of freshwater bivalves. J Shell Res, 17(5): 1395—1405
- Palumbi S R, Benzie J, 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. Mol Mar Biol Biotech, 1(1): 27—34
- Patwary M U, Kenchington E L, Bird C J *et al.*, 1994. The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of

the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J Shell Res*, 13(2): 547—553

Suneetha K B, Dagle G, Nevdal G, 2000. Analysis of mitochondrial DNA sequence from two *Maurolicus* taxa: evidence for separate species? *J Fish Biol*, 57: 1605—1609

Wilbur A, Orbach E A, Wakefield J R *et al*, 1997. Mitochondrial genotype variation in a siberian population of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *J Shell Res*, 16(2): 541—545

SEQUENCE POLYMORPHISM OF MITOCHONDRIAL 16S rRNA GENE FRAGMENT IN SCALLOP *CHLAMYS FARRERI*

LIU Ya-Jun, YU Zi-Niu, JIANG Yan-Yan, ZHANG Liu-Suo,
KONG Xiao-Yu, SONG Lin-Sheng

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract DNA sequencing is very useful for the genetic diversity analysis at molecular level. Mitochondrial 16S rRNA gene fragment of Scallop *Chlamys farreri* was amplified via polymerase chain reaction (PCR), the PCR products were ligated into T-vector, cloned and sequenced for 31 individuals, 3 populations of China (8 for Dalian and Qingdao each, and 7 for Yantai) and one population of Republic of Korea. 634 base-pair nucleotide sequences were examined and analyzed for genetic polymorphism. Resultant sequences data analysis showed that all 31 sequences were grouped into 18 haplotypes and there were 26 variable nucleotide positions in this gene fragment, which included transitions and transversions, and no insertion/ deletion were observed. The genetic diversity indexes including S (polymorphic sites), P (nucleotide diversity) and K (average number of nucleotide difference) were calculated and the results indicated that Korea population showed more variation than others and more differences to others, followed by Yantai and Qingdao population, and Dalian population had the least sequence variation. Parameters of genetic variation among the four populations suggested that no significant genetic difference was observed. Our data provided baseline information at DNA level on the genetic variation in wild Scallop populations and may be useful for future management and utilization of the resource.

Key words *Chlamys farreri*, Mitochondrial DNA (mtDNA), 16S rRNA gene, DNA sequencing