

福寿螺3个地理群体遗传多样性的ISSR分析

徐建荣 韩晓磊 郁建锋 黄佳 (常熟理工学院生物与食品工程系, 江苏常熟 215500)

摘要 [目的] 探讨我国不同地区福寿螺的遗传多样性和遗传结构。[方法] 应用ISSR分子标记技术对我国江苏苏州、福建漳州、广东珠海3个不同地理群体福寿螺的遗传多样性和遗传结构进行了分析。[结果] 从77个ISSR引物中筛选出3个引物对福寿螺3个群体60个样品进行扩增, 得到33个清晰的扩增位点, 多态位点为31个。江苏、福建和广东3个福寿螺群体的Shannon's指数分别为0.353 6、0.424 7、0.279 6, 由此分析, 其遗传变异主要来自于群体内个体间。福寿螺UPGMA聚类图显示, 广东群体和福建群体首先聚在一起, 再与江苏群体聚类。3个群体的遗传多样性处于相同水平上, 且遗传多样性高低依次为福建群体>江苏群体>广东群体。[结论] 3个地区福寿螺群体产生一定的遗传分化, 表明福寿螺具有广适性的遗传特性。

关键词 福寿螺; 遗传多样性; ISSR分析

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13561-03

Analysis on the Genetic Diversity of Three Geographic Populations of *Pomacea canaliculata* by Using ISSR Marker

XU Jianrong et al (Department of Biology and Foodstuff Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500)

Abstract [Objective] The aim of the study was to discuss the genetic diversity and structure of *Pomacea canaliculata* in different areas in China. [Method] The genetic diversity and structure of 3 geographic populations of *P. canaliculata* from Suzhou of Jiangsu, Zhangzhou of Fujian and Zhuhai of Guangdong in China was analyzed by using ISSR molecule markers. [Result] Three primers were screened from 77 ISSR primers to make the amplification on 60 samples randomly collected from 3 populations of *P. canaliculata* and 33 clear amplified loci were obtained, in which the polymorphic loci were 31. The Shannon's Information index of 3 geographic populations of *P. canaliculata* from Jiangsu, Fujian and Guangdong were 0.353 6, 0.424 7 and 0.279 6, resp. The analysis on above indexes revealed that the genetic variation mainly came from individuals within populations. The UPGMA clustering figure of *P. canaliculata* based on ISSR data suggested that 2 populations from Guangdong and Fujian were clustered at first, and then they clustered with populations of Jiangsu. The results of ISSR analysis indicated that the genetic diversity of these three populations were at the same level, with their order of Fujian population > Jiangsu population > Guangdong population. [Conclusion] *P. canaliculata* population from 3 areas had some genetic differentiation, showing that *P. canaliculata* had the genetic character of wide adaptability.

Key words *Pomacea canaliculata*; Genetic diversity; ISSR analysis

福寿螺(*Pomacea canaliculata*)又称大瓶螺、苹果螺,分类上属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、中腹足目(Mesogastropoda)、瓶螺科(Ampullariidae)、瓶螺属(*Pomacea*),原产南美洲亚马逊河流域。20世纪70年代末,台湾水产养殖业者把福寿螺当作美食从巴西引进台湾,从此福寿螺开始了它的亚洲之旅^[1-2]。但由于福寿螺肉质不受欢迎,市场发展不如预期,所以逐渐被人们遗弃,逸为野生,并迅速扩散到田间,成为一种新的农业有害生物^[3]。福寿螺生长快、食性杂、食量大、繁殖力强、适应性广,在我国30°N以南的省份均有危害农作物的报道^[4]。福寿螺也是人畜共患的寄生虫广州管圆线虫的中间宿主,1只福寿螺可检出6000多条广州管圆线虫幼虫,人生吃或者食用未煮熟的带寄生虫螺肉,会引起食源性“广州管圆线虫病”(嗜酸性脑膜炎)^[5]。由于福寿螺所引起的经济与生态问题突出,2001年福寿螺被列入世界100种恶性外来入侵生物名录之中;福寿螺也是国家环保局2003年首批公布的入侵我国的16种“危害最大的外来物种”之一^[6-7]。

福寿螺作为一种外来引入物种,越来越引起人们的重视,对于福寿螺的研究早期主要集中在其基础生物学、生态学及养殖学等方面^[8],近期主要集中在其对农作物(特别是水稻)的危害与防治等方面^[9],涉及遗传学方面的研究仅见于Thaewon-ngi w用RAPD技术对引进福寿螺和泰国当地福寿螺的遗传分析^[10]。笔者采用ISSR分子标记技术,以我国江苏苏州、福建漳州、广东珠海3个不同地区的福寿螺群体

为研究对象,探讨不同地区福寿螺的遗传多样性和遗传结构,了解福寿螺的种群动态,为福寿螺的控制与管理提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验所用的福寿螺分别采自江苏苏州(120°32'E, 31°32'N)、广东珠海(113°52'E, 22°30'N)和福建漳州(117°35'E, 24°52'N)3个地区,分别命名为江苏群体、广东群体和福建群体。取活体福寿螺的斧足肌为材料,于-20℃无水乙醇中保存备用。每个群体取样20个,进行DNA提取和ISSR分析。

1.2 方 法

1.2.1 基因组DNA的提取。基因组DNA的提取参照文献[11]。用Eppendorf公司生产的Bo Photo meter核酸检测仪和琼脂糖凝胶电泳检测DNA溶液浓度与纯度,并将浓度稀释至30 ng/μl,置-20℃保存备用。

1.2.2 ISSR-PCR扩增及产物检测。试验所用MgCl₂、dNTP及Taq DNA聚合酶等试剂由上海生工提供,引物是University of British Columbia设计的成套引物,由上海生工合成。PCR反应在德国Bonetree公司的Gradient梯度PCR仪上进行。PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色后检测,DGL2000 Marker作为分子量标准,UVP凝胶成像系统记录图像。

1.3 数据分析 将ISSR电泳图谱记录后进行人工读带,同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物,有带的记为1,无带的记为0,得出0,1原始数据矩阵。统计的遗传学参数为:多态位点比率(P) = 多态位点数/位点总数 × 100%;遗传相似系数(S_{xy}) = $2N_{xy} / (N_x + N_y)$,其中 N_{xy} 是个体 x 和个体 y 共有的位点数, N_x 和

基金项目 江苏省教育厅资助项目(JHZD07-032)。

作者简介 徐建荣(1962-),男,江苏常熟人,副教授,从事水生生物繁殖、养殖生物学的教学与研究工作。

收稿日期 2008-09-04

N_x 分别是个体 x 和个体 y 总位点数;遗传距离($D = 1 - S$), 式中 S 为相似系数。

利用 POPGENI .32 计算遗传相似度、遗传距离和遗传多样性等;利用 MEGA3.0 软件构建 UPGMA 系统树。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及 ISSR PCR 扩增结果 用经过优化的 PCR 扩增反应体系,从 77 个引物中筛选出多态性好、条带均匀清晰的 3 个引物(表 1),对福寿螺 3 个地理群体的 60 个 DNA 样品进行 PCR 扩增。3 个 ISSR 引物在 3 个群体中共得到 33 个位点,多态位点比率在 91%~100%(表 1)。PCR 扩增片段大小范围为 100~1 800 bp,多数片段集中在 250~1 000 bp。图 1

为引物 32 在福寿螺江苏群体中的扩增图谱。

表 1 3 个 ISSR 引物对福寿螺的扩增结果

Table 1 The amplification results of *Pomacea canaliculata* with 3 ISSR primers

引物 Primer	序列 Sequence	扩增位点数 No. of amplified loci	多态性位数 No. of polymorphic loci	多态位点比率 Percentage of polymorphic loci %
32	(AG) ₈ AC	10	10	100
33	(AG) ₈ AT	12	11	92
56	(AG) ₈ TT	11	10	91
平均 Average	-	11	10.33	94.33

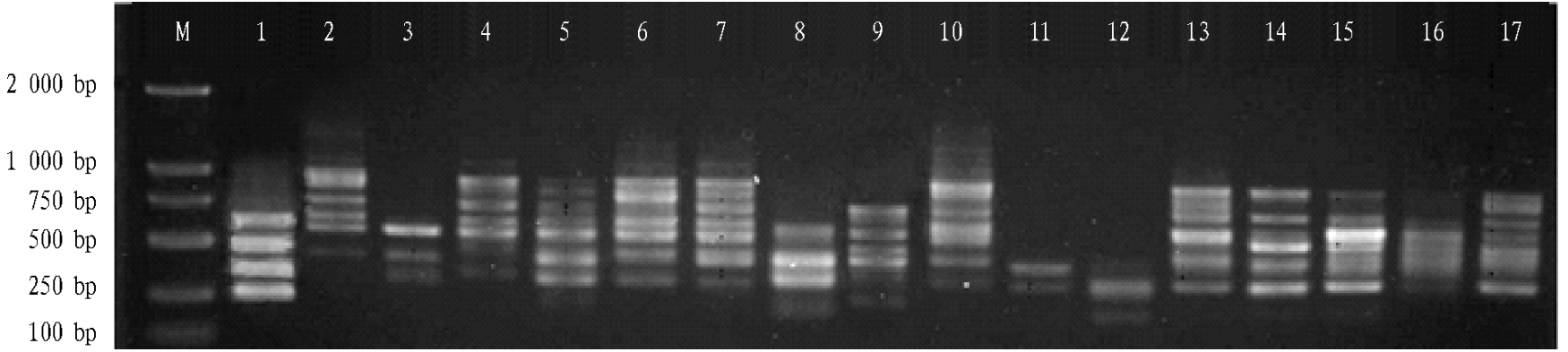


图 1 引物 32 在福寿螺江苏群体中的 ISSR 扩增结果

Fig.1 ISSR amplification results of primer 32 in the population of *P. canaliculata* from Jiangsu

2.2 群体遗传多样性 不同地理群体的多态位点比率有明显差异,其中福建群体的多态位点比率最高,江苏群体次之,广东群体最低;3 个群体平均杂合度和 Shannon s 指数高低依次为福建>江苏>广东。在物种水平上,福寿螺的多态位点比率达 93.94%,平均杂合度为 0.323 5,Shannon s 指数为 0.409 2;在群体水平上,其平均多态位点比率为 60.61%,平均杂合度为 0.241 0,Shannon s 指数为 0.352 6(表 2)。

表 2 不同地理群体内福寿螺遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of *P. canaliculata* in different geographic populations

群体 Population	扩增位点数 No. of amplified loci	多态位点比率 % Percentage of polymorphic loci	Shannon s 指数 Shannon's index	平均杂合度 Average heterozygosity
福建 Fujian	23	69.70	0.424 7	0.294 0
江苏 Jiangsu	21	63.64	0.353 6	0.238 7
广东 Guangdong	16	48.48	0.279 6	0.190 3
群体水平 Population level	20	60.61	0.352 6	0.241 0
物种水平 Species level	31	93.94	0.409 2	0.323 5

2.3 群体遗传分化和聚类分析 由表 3 可见,福寿螺 3 个地理群体的遗传相似度较高,遗传距离较小,其中广东群体与福建群体遗传距离最为接近(0.102 0),而广东群体与江苏群体遗传距离较远(0.215 8)。根据遗传多样性水平在物种水平的基因多样性(H_p)和群体水平的基因多样性(H_{pop})的分化,各群体间的由 Shannon s 指数估算的遗传变异[($H_p - H_{pop}$)/ H_p]=0.287 0 显示,有 71.30% 的遗传变异存在于群体内个体间,28.70% 的遗传变异存在于群体间。

根据 3 个群体间的遗传距离和遗传相似性系数,用 UPGMA 法构建聚类图(图 2),3 个群体分为 2 支,广东群体和福

建群体首先聚在一起,最后与江苏群体聚类。

表 3 福寿螺 3 个群体间遗传距离(左下方)和遗传相似性系数(右上方)矩阵

Table 3 The genetic distance (down left side) and genetic similarity coefficient matrix (up right side) among 3 populations of *P. canaliculata*

群体 Population	广东 Guangdong	福建 Fujian	江苏 Jiangsu
广东 Guangdong	-	0.903 0	0.805 9
福建 Fujian	0.102 0	-	0.826 0
江苏 Jiangsu	0.215 8	0.191 2	-

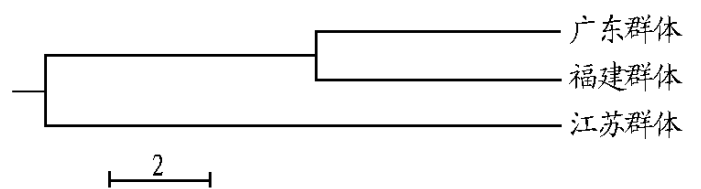


图 2 福寿螺 3 个地理种群的 UPGMA 聚类图

Fig 2 UPGMA clustering among 3 geographic populations of *P. canaliculata*

3 讨论

3.1 遗传多样性水平 生物群体的遗传多样性是评价生物资源状况的一个重要依据,它是物种适应多变的环境、维持长期生存和进化的遗传基础。多态位点比率和平均杂合度是检验种群遗传多样性的常用指标^[2]。该研究通过比较 3 个地区福寿螺群体的多态位点比率和平均杂合度发现,其遗传多样性处于相同水平上,且遗传多样性高低依次为福建群体>江苏群体>广东群体。通过 Shannon s 指数分析同样得出了以上结论。林瑞余等用 ISSR 技术分析水葫芦(*Eichhornia crassipes*),发现其多态位点比率仅 50.0%,Shannon s 指数平均值为 0.273 9,Nei s 指数平均值为 0.189 4^[13],其遗传多样性小于福寿螺。水葫芦是 20 世纪 30 年代作为猪饲料由南美引入我国,现已成为影响我国南方水域环境的外来入侵生

物。福寿螺与水葫芦都是人为从南美引进的外来生物,其生态习性有一定的相似性,其不同群体的栖息地相对稳定,自然状态下群体间交流较少。福寿螺的遗传多样性高于水葫芦可能与其引进时间稍晚有关。

3.2 不同地理群体的遗传分化 由UPGMA 聚类图分析表明,广东群体和福建群体遗传关系较近,首先聚在一起,然后与江苏群体聚类,这与福寿螺的地理群体分布一致。刘必谦等应用RAPD 技术对胶东半岛4 个地区的大连湾牡蛎(*Castrea talienwhanensis*) 邻域种群进行了分析,结果表明:相邻地区种群间的遗传距离较小,地理位置相距越远则遗传差异越明显^[14]。黄文坤等对外来入侵植物紫茎泽兰群体遗传多样性研究表明,群体间的遗传距离与其地理分布具有一致性^[15]。福寿螺广东和福建群体间地理距离较近,遗传距离相对较小(0.102 0),江苏和广东群体间地理距离较远,遗传距离最大(0.215 8),表现为地理距离的增加与群体的遗传距离呈正相关。

遗传相似度和遗传距离结果表明,福寿螺3 个不同地理群体的亲缘关系较近。Thorp^[16] 认为:同种群遗传相似系数(S) = 0.80 - 0.97(遗传距离 D = 0.03 - 0.20),因而广东、福建和江苏3 个地理群体的福寿螺为同一物种,这与其是外来种的身份相符合。而由Shannon's 指数估算的遗传变异情况揭示3 个群体间已经产生了一定的遗传分化。福寿螺生长快、繁殖力强,对不同的自然生境有较强的适应能力,其遗传分化的产生就是其对广东、福建和江苏3 个地区不同生境适应的结果。福寿螺广适性的遗传特性,也是其成功入侵、定居不同胁迫环境的有力武器之一,必须引起广泛重视。

(上接第13560 页)

劣,确定了SDS 法为最优方案,SDS-CTAB 次之,这与李绍兰等、曾大兴、李岩等的研究结果相同或相近^[9-11]。SDS 法及SDS-CTAB 法可有效地破坏细胞膜,并溶解外溢的DNA,试验方法设计合理,基本不会对染色体DNA 造成损伤。分析结果表明,所提取的DNA 样品能很好地满足后续的生物操作,而且快捷、方便、成本低、安全可靠。而CTAB 法中CTAB 虽然有利于去除多糖等物质^[12],但由于菌丝量及菌体细胞壁厚等多因素的限制,导致其在真菌基因组DNA 的提取上受到一定的限制,该法主要广泛应用于植物DNA 的提取。高盐沉淀法主要应用了盐析作用使DNA 从膜中释放出来,但由于纯化不完全,造成DNA 纯度的降低。目前,应用于丝状真菌DNA 的提取方法还有尿素提取法^[13]、硅胶破壁法^[14]、石英砂研磨法^[15] 等方法,若能将这些方法与SDS 法、SDS-CTAB 法等科学合理地结合起来,将会大大提高基因组DNA 的提取质量。由于镰刀菌是一种典型的丝状真菌,所以试验结果对其他丝状真菌基因组DNA 的提取有一定的借鉴意义。

参考文献

[1] GLEPP M, RUSSELL P J, WELCH J A, et al. Method for DNA extraction from *Candida albicans* [J]. *Anal Biochem*, 1987, 164(1): 207-213.

参考文献

- [1] MOCHDA O. Spread of freshwater *Pomacea* snails (Hydrobiidae, Mollusca) from Argentina to Asia [J]. *Microbiologia*, 1991, 3: 51-62.
- [2] 傅先元, 王洪全. 大瓶螺繁殖生态学研究 [J]. 浙江海洋学院学报, 2000, 19(1): 38-42.
- [3] 蔡汉雄, 陈日中. 新的有害生物——大瓶螺 [J]. 广东农业科学, 1990 (5): 36-38.
- [4] 周卫川, 吴宇芬. 福寿螺在中国的适应性研究 [J]. 福建农业学报, 2003, 18(1): 25-28.
- [5] 邢文鸾, 潘长旺, 梁韶辉, 等. 福寿螺体内广州管圆线虫幼虫分布情况的研究 [J]. 温州医学院学报, 1998(4): 25-29.
- [6] IUCN. 1986 IUCN Red List of Threatened Animals [M]. Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. IUCN Conservation Monitoring Centre, 1988.
- [7] 李振宇, 解焱. 中国外来入侵种 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2002.
- [8] 尹绍武, 颜亨梅, 王洪全, 等. 福寿螺的生物学研究 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2000, 23(2): 76-82.
- [9] 翁丽青, 陈亚雄. 茭白田福寿螺生物学特性、危害及防治现状 [J]. 浙江农业科学, 2006(1): 2-3.
- [10] THAEVNONNG WB, KIINBUNGA S, PHANWICHEN K, et al. Genetic diversity of introduced (*Pomacea canaliculata*) and native (*Pila*) apple snails in Thailand revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. *Science Technology Dev*, 2003, 20: 289-306.
- [11] SAMBROCK J, FRITSCH E F, MANIATIS C. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金东雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] RICHARDS C, LEKBERG P L. Temporal changes in allele frequencies and a population's history of severe bottlenecks [J]. *Conserv Biology*, 1996, 10: 832-839.
- [13] 林瑞余, 孙红艳, 赵瑞宗, 等. 福建不同水域水葫芦遗传多态性的ISSR 分析 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2008, 37(2): 175-181.
- [14] 刘必谦, 戴继勋, 喻子牛. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用 [J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 82-87.
- [15] 黄文坤, 郭建英, 万方浩, 等. 紫茎泽兰群体遗传多样性及遗传结构的 AFLP 分析 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 992-1000.
- [16] THORP J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [J]. *Annual Review Ecology System*, 1982, 13 (1): 139-168.
- [2] 韩利刚, 袁毅, 王昱, 等. 丝状真菌组织DNA 的提取 [J]. 生物技术, 1996, 9(6): 38-40.
- [3] MAMANS, SREENIVASAPRASAD S, MILLS P R. DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 33(4): 307-310.
- [4] 胡小平, 杨家荣, 商文静, 等. 苹果黑星病菌DNA 提取方法研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(4): 41-43.
- [5] 吴志虹, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体DNA 提取法 [J]. 菌物系统, 2001, 20(4): 575-577.
- [6] 漆艳香, 谢艺贤, 张欣, 等. SDS-CTAB 和高盐沉淀法提取香蕉枯萎病菌基因组DNA 的比较 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(3): 49-52.
- [7] HE Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation [J]. *Mycosystema*, 2000, 19(3): 434-437.
- [8] MOLLER E M, BAHNWEIC G, SANDERMANN H, et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(22): 6115-6116.
- [9] 李绍兰, 周斌, 杨丽源, 等. 真菌DNA 提取方法的改良 [J]. 云南大学学报, 2002, 24(6): 471-472.
- [10] 曾大兴. 适于RAPD 分析的真菌DNA 提取方法 [J]. 生物技术, 2003, 13 (2): 20-21.
- [11] 李岩, 蒋继志, 梁宁. 一种快速提取丝状真菌染色体DNA 的方法 [J]. 生物学杂志, 2006, 23(6): 52-53.
- [12] 程度, 黄翔宇, 李宝健. 药用真菌高质量总DNA 的制备及基因组文库的构建 [J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 137-139.
- [13] 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 一种快速简便的植物病原真菌基因DNA 提取方法 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362-365.
- [14] 张桂敏, 唐文杰, 班静, 等. 硅胶破碎法抽提真菌染色体DNA [J]. 湖北大学学报, 2006, 2(1): 69-71.
- [15] 袁洪水, 李术娜, 张爱莲, 等. 石英砂研磨法快速提取顶头孢霉染色体DNA [J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 8-11.