

文章编号 : 1004 - 7271( 2005 )01 - 0001 - 05

# 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性的 RAPD 分析

李家乐<sup>1</sup>, 钱荣华<sup>1</sup>, 鲍宝龙<sup>1</sup>, 汪桂玲<sup>1</sup>, 戚鸟定<sup>2</sup>

( 1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090 ;

2. 浙江七大洲珠宝有限公司, 浙江 诸暨 311804 )

**摘要** : 用 OPJ 和 OPM 两组 40 条 10 碱基随机引物, 对中国五大湖三角帆蚌地理群体及诸暨养殖蚌进行了随机扩增多态性 DNA ( RAPD ) 分析, 其中 12 个引物的扩增结果具有丰富的群体多态性, 多态率为 55.6% ~ 80%。群体内遗传相似度大小依次为 : 鄱阳湖 ( 0.888 9 ), 太湖 ( 0.869 4 ), 洞庭湖 ( 0.811 1 ), 诸暨 ( 0.774 6 ), 洪泽湖 ( 0.734 8 ), 巢湖 ( 0.718 5 )。依据群体间遗传距离指数及分子系统树, 表明洞庭湖群体和洪泽湖群体亲缘关系最近, 鄱阳湖群体则与巢湖群体的亲缘关系最近, 并且诸暨人工养殖群体与鄱阳湖和巢湖的群体比较接近。

**关键词** : 五大湖 ; 三角帆蚌 ; 群体 ; RAPD

中图分类号 : S 917 文献标识码 : A

## RAPD analysis on genetic diversity among the stocks of *Hyriopsis cumingii* from the five large lakes of China

LI Jia-le<sup>1</sup>, QIAN Rong-hua<sup>1</sup>, BAO Bao-long<sup>1</sup>, WANG Gui-ling<sup>1</sup>, QI Niao-ding<sup>2</sup>

( 1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by Ministry of

Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China ;

2. Zhejiang Seven Continents Jewellery Co., Ltd., Zhuji 311804, China )

**Abstract** : With the random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) analysis method, forty ten-base arbitrary primers of OPJ and OPM groups were used to study the genetic variability among geographic stocks of *Hyriopsis cumingii* from the five large lakes of China : Po-yang Lake ( PY ), Dong-ting Lake ( DT ), Tai Lake ( TH ), Chao Lake ( CH ) and Hong-ze Lake ( HZ ), and one cultured stock from Zhuji City ( ZJ ) of Zhejiang Province. The amplified results of twelve primers showed abundant polymorphism, and the percentage of polymorphism with each primer amplified varied 55.6% to 80%. The intra-stock genetic similarity indexes ranked as PY ( 0.888 9 ) > TH ( 0.869 4 ) > DT ( 0.811 1 ) > ZJ ( 0.774 6 ) > HZ ( 0.734 8 ) > CH ( 0.718 5 ). Based on inter-stock genetic distance indexes and molecular phylogenetic tree, we can conclude that the phylogeny relation between DT and HZ stocks is closest, and the cultured stock from ZJ is relatively close to the cluster of PY and CH stocks.

**Key words** : the five large lakes ; *Hyriopsis cumingii* ; stock ; random amplified polymorphic DNA

收稿日期 : 2005-01-06

基金项目 : 上海市科委基础重点项目 ( 03JC14063 ) 和上海市教育基金会曙光计划项目 ( 01SG42 )

作者简介 : 李家乐 ( 1963 - ) 男, 浙江乐清人, 教授, 博士生导师, 主要从事水产种质资源与养殖生态研究。Tel : 021 - 65710216 ;

E-mail : jlli@shfu.edu.cn

目前,世界珍珠产量已超过了 1 200 t,其中 95% 以上是淡水珍珠,淡水珍珠 95% 以上是我国生产的,而这其中的 95% 以上又是由我国的特有种三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)育出的,因此三角帆蚌是最主要的珍珠养殖母蚌。在珍珠产量增加的同时,养殖淡水珍珠的质量却越来越差,并且养殖三角帆蚌的病害日益严重,筛选或选育出优良品质的三角帆蚌种质是当前亟需解决的关键问题之一。三角帆蚌自然群体主要分布于我国的鄱阳湖、洞庭湖、太湖、巢湖和洪泽湖等湖泊及其周围河流内。国内对马氏珠母贝等海水贝类的种质资源进行了较多的研究<sup>[1-3]</sup>,在淡水贝类,仅见养殖和野生三角帆蚌的遗传多样性比较<sup>[4]</sup>,但对三角帆蚌天然种质资源的状况至今没有进行研究。本研究采用 RAPD 方法<sup>[5]</sup>对五大湖的三角帆蚌的不同群体的遗传多样性和遗传距离及群体间的亲缘关系进行了分析,为天然种质资源的保护与合理利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

五个群体的三角帆蚌于 2001 年 11 月至 2002 年 2 月分别取自潘阳湖(PY)、洞庭湖(DT)、太湖(TH)、巢湖(CH)与洪泽湖(HZ)五大淡水湖泊,取样地点均为离湖岸较远的深水处,一个对照的人工养殖群体取自浙江诸暨(ZJ)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的制备

解剖活蚌,取外套膜 250 mg,用滤纸吸干水分,置于铝箔上剪碎,加入裂解缓冲液 500  $\mu$ L 于旋涡混合器上充分混合,置于水浴摇床上 40 $^{\circ}$ C 消化 38 h。基因组 DNA 抽提采用标准的酚-氯仿方法<sup>[6]</sup>。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。紫外分光光度计定量和检测 DNA 浓度和纯度。

#### 1.2.2 RAPD

采用 40 条 10 碱基随机引物(Operon 公司)分别对五大湖三角帆蚌天然群体和一个人工养殖群体的 15~20 个基因组 DNA 样本进行 PCR 扩增。扩增反应体系 25  $\mu$ L,包括 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)、50 mmol/L KCl、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1 mmol/L dNTP、0.1 mmol/L 随机引物、25 ng 基因组 DNA、1U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 变性 45 s、36 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 45 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,FR-200 凝胶成像系统中成像。

#### 1.2.3 数据处理

群体内遗传距离( $P$ )根据 Nei 等<sup>[7]</sup>的公式计算: $F = \{\sum[2N_{xy} / (N_x + N_y)]\} / n$ ,  $P = 1 - F$ 。其中, $F$  为遗传相似率(共享度), $N_{xy}$  为两个体间的共享带数, $N_x$  和  $N_y$  分别为个体  $X$ 、 $Y$  的扩增带数, $n$  为个体间两两比较配对数, $P$  为遗传距离。

群体间遗传距离( $D$ )根据 Lynch<sup>[8]</sup>的计算方法计算。 $D = -\ln I$ ,  $I = (J_x J_y) / (J_x J_y)^{1/2}$ ,其中  $J_x$ 、 $J_y$  和  $J_{xy}$  分别为所有位点上  $j_x$ 、 $j_y$  和  $j_{xy}$  的算术平均值。 $j_x = \sum X_i$ ,  $j_y = \sum Y_i$ ,  $j_{xy} = \sum X_i Y_i$ 。  $X_i$ 、 $Y_i$  分别为群体  $X$ 、 $Y$  中第  $i$  个等位基因的频率。

应用 PHYLIP 3.5C 软件包中的“UPGMA”和“NJ”程序构建 6 个群体的聚类关系图。

## 2 结果

### 2.1 RAPD 扩增结果

用 40 个随机引物对五个群体及一个人工群体进行扫描,筛选出 12 个引物可产生稳定清晰的扩增带。用这 12 个引物进行扩增,每个引物的扩增带数为 7~13 条,扩增片段大小为 0.25~3.0 kb,多态率为 55.6%~80%。表明所采用的 12 个引物能扩增出足够数量的条带,可以充分区分群体以及反映群体内的遗传多态性。表 1 列出了随机引物序列及其扩增结果。图 1 为部分引物的扩增图谱。

表 1 随机引物序列及其扩增结果

Tab.1 Sequences of random primers and their amplified results

引物号	引物序列(5'-3')	G,C 含量	扩增总带数	可变条带数	多态百分率
OPJ01	CCCGGCATAA	0.6	11	7	63.6%
OPJ03	TCTCCGCTTG	0.6	9	6	66.7%
OPJ12	GTCCCGTGGT	0.7	9	5	55.6%
OPJ17	ACGCCAGTTC	0.6	8	6	75.0%
OPJ19	GGACACCACT	0.6	8	5	62.5%
OPM03	GGGGATGAG	0.8	7	4	57.1%
OPM04	GGCGTTGTC	0.7	13	10	76.9%
OPM09	GTCITGCGGA	0.6	8	6	75.0%
OPM10	TCTGGCCGAC	0.7	7	5	71.4%
OPM17	TCAGTCCGGG	0.7	10	8	80.0%
OPM18	CACCATCCGT	0.6	9	6	66.7%
OPM20	AGGTCTTGGG	0.6	12	9	75.0%
合计		0.65	111	86	77.5%

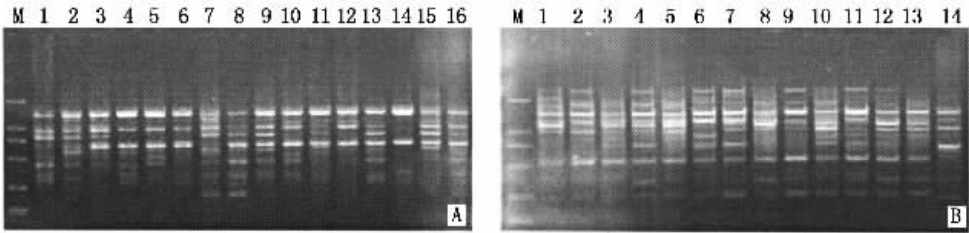


图 1 引物 OPM17 (A) 和引物 OPM4 (B) 对三角帆蚌不同群体的扩增图谱

Fig.1 RAPD patterns of different stocks of random primers OPM17 (A) and OPM4 (B)

A: M 为 marker DL 2000, 1~3 为 PY 群体, 4~6 为 DT 群体, 7~9 为 TH 群体,  
10~12 为 CH 群体, 13~14 为 HZ 群体, 15~16 为 ZJ 群体;

B: M 为 marker DL 2000, 1~7 为 BY 群体, 8~13 为 CH 群体, 14 为 ZJ 群体的扩增结果

## 2.2 扩增片段遗传相似度和遗传距离指数

对扩增片段在个体间与群体间进行 RAPDs 统计, 得出群体内和群体间的遗传相似度和遗传距离指数(表 2)。群体内遗传相似度大小依次为: 鄱阳湖(0.888 9), 太湖(0.869 4), 洞庭湖(0.811 1), 诸暨(0.774 6), 洪泽湖(0.734 8), 巢湖(0.718 5)。群体间, 鄱阳湖与诸暨群体的遗传相似度最大(0.873 8), 遗传距离最小(0.126 2), 而洞庭湖与太湖群体的遗传相似度最小(0.683 0), 遗传距离最大(0.317 0)。

表 2 三角帆蚌群体内和群体间的遗传相似度和遗传距离

Tab.2 Intra-and inter-stock genetic similarity indexes and genetic distances of *Hyriopsis cumingii*

群体名称	PY	DT	TH	CH	HZ	ZJ
PY	0.888 9	0.766 7	0.847 4	0.767 7	0.822 8	0.873 8
DT	0.233 3	0.811 1	0.683 0	0.777 4	0.761 6	0.746 8
TH	0.152 6	0.317 0	0.869 4	0.703 3	0.771 2	0.842 1
CH	0.232 3	0.222 6	0.296 7	0.718 5	0.783 2	0.743 3
HZ	0.177 2	0.238 4	0.228 8	0.216 8	0.734 8	0.830 8
ZJ	0.126 2	0.253 2	0.157 9	0.256 7	0.169 2	0.774 6

注: 右上方矩阵数字表示群体间遗传相似度, 左下方矩阵数字表示群体间遗传距离, 中间对角线数字表示群体内遗传相似度

## 2.3 聚类分析

根据 6 个三角帆蚌群体间的遗传距离指数,应用 UPGMA 和 NJ 两种方法构建分子系统树,见图 2 与图 3。不同的两种方法构建的系统树都清楚地表明了洞庭湖(DT)和洪泽湖(HZ)群体亲缘关系最近,鄱阳湖(PY)群体则与巢湖(CH)群体的亲缘关系最近,并且诸暨(ZJ)的人工养殖群体与鄱阳湖(PY)则和巢湖(CH)群体比较接近。两分子系统树略有不同的是太湖(TH)群体分支距离不一样。

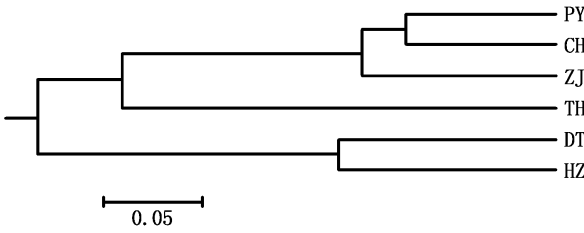


图 2 UPGMA 法构建的 6 群体三角帆蚌分子系统树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree constructed by the UPGMA method for six stocks of *Hyriopsis cumingii*

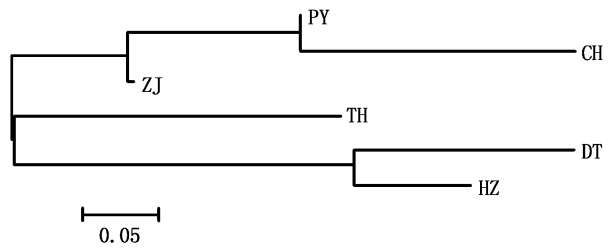


图 3 NJ 法构建的 6 群体三角帆蚌分子系统树

Fig.3 Molecular phylogenetic tree constructed by the NJ method for six stocks of *Hyriopsis cumingii*

## 3 讨论

三角帆蚌是一种运动非常缓慢的淡水贝类,除钩介幼虫期附着在鱼体上有较远的迁徙外,它的活动范围非常有限。由于不同的地理与生态条件,使三角帆蚌在不同水域形成了遗传性能上互有差别的地理隔离群体。6 群体内的遗传相似度为 0.718 5~0.888 9,以鄱阳湖群体遗传相似度(0.888 9)最大,其次为太湖、洞庭湖群体,说明这三个群体内个体间的差异较少,纯度较高,遗传多样性较低,这可能与这些水体面积大,环境比较稳定有关。而洪泽湖群体与巢湖群体的遗传相似度较低,个体间差异大,遗传多样性较高,这可能与巢湖与洪泽湖的面积相对较少,环境不稳定有关,历史上这两个湖泊曾出现过大面积干涸现象。从我们生长试验的结果来看<sup>[9]</sup>,又以鄱阳湖群体的生长最快,洪泽湖群体生长最慢,可能与这些湖的三角帆蚌纯度越高、有利于生长的基因越丰富有关。五大湖三角帆蚌生长性能与群体内遗传变异度是否存在某种程度的相关性还有待进一步研究。

群体间的遗传相似度与遗传距离指数能反映群体间的亲缘关系。本研究中,五大湖三角帆蚌群体间遗传相似度为 0.683 0~0.873 8,表明我国五大湖三角帆蚌的变异水平较高,遗传多样性较丰富。鄱阳湖与巢湖两群体的亲缘关系较近,可能是由于鄱阳湖与巢湖地理位置相隔较近的缘故。洪泽湖群体与除洞庭湖群体以外其它群体亲缘关系相对较远,因洪泽湖属于淮河水系,其它群体均属于长江水系,其地理位置相隔较远有关,这与五大湖形态学研究结果相似<sup>[10]</sup>。洪泽湖群体与洞庭湖群体的亲缘关系较近,这是否与洪泽湖干枯后洞庭湖等养殖群体进入有关还需要进一步研究。在群体间遗传距离的研究结果可以看到,诸暨蚌与五大湖群体的遗传距离相对于五大湖群体间要少,以鄱阳湖与诸暨的遗传距离最小(0.126 2),而诸暨与鄱阳湖、诸暨与巢湖两群体的亲缘关系相对与其它群体要近,这是因为本实验选用的诸暨当地三角帆蚌是鄱阳湖和巢湖群体杂交繁殖的后代。诸暨人工养殖群体的生长不及鄱阳湖群体的结果表明,目前该场人工养殖的三角帆蚌品种已经退化,需要更新。

三角帆蚌是我国现有最主要的淡水育珠蚌,是我国特有种。本次研究表明,我国五大湖三角帆蚌具有一定的遗传变异潜力,说明它们存在着一定的遗传多样性。三角帆蚌遗传多样性是其资源保护和良种选育的基础。在人工育苗过程中,应采取增大有效繁殖群体等措施,防止近交衰退、遗传瓶颈和遗传漂变。我国于 1994 年建立了东洞庭国家级自然保护区,在这个保护区内有三角帆蚌资源,要加强对这个保护区内的三角帆蚌种质资源的保护,同时,考虑到三角帆蚌种质的特殊性,建议建立洞庭湖、鄱阳湖等三角帆蚌保护区,以保护我国特有的具有重要经济价值的三角帆蚌优良种质的遗传多样性。

## 参考文献：

- [1] 王爱民, 邓凤蛟, 张锡元, 等. 马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, 46(4): 467-470.
- [2] 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  $F_1$  的 RAPD 标记[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 484-491.
- [3] 刘必谦, 戴继勋. 巨蛎属牡蛎遗传多样性研究[J]. 水产学报, 1998, 22(3): 193-197.
- [4] 华丹, 顾若波, 白云飞, 等. RAPD 分析野生和养殖三角帆蚌的遗传多样性[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 540-544.
- [5] Williams J G K, Hanafey M K, Rafalski J A, *et al.* Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA marker[J]. Methods Enzymol, 1993, 218: 704-740.
- [6] 金冬雁, 黎孟枫, 张励, 等(译). 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 464-469.
- [7] Nei M, Wilbur A E. Mathematical model for studying genetic variation in germs of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [8] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 478-484.
- [9] 钱荣华. 中国五大湖三角帆蚌群体形态、生长与分子遗传比较研究[D]. 上海水产大学硕士论文, 2003. 28-38.
- [10] 钱荣华, 李家乐, 董志国, 等. 中国五大湖三角帆蚌形态差异分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(4): 112-119.

---

## 关于成立中国水产学会鱼病研究会华东鱼类健康促进会的 ——倡议书

华东地区拥有丰富的水产养殖资源, 养殖面积广阔、养殖品种繁多, 无论是养殖产量、还是养殖技术在我国占有重要地位, 同时该地区既有密集的水产高校与科研院所, 还拥有众多的渔药、饲料生产企业, 对推动我国水产养殖业的发展起着积极作用。

然而随着水产养殖业的迅猛发展, 水产动物病害频繁发生, 已成为制约水产养殖业发展的瓶颈, 这也给鱼病学研究工作者提出了新的挑战。为了更有效、更有针对性地做好华东地区水产养殖动物病害产、学、研工作, 更紧密地加强华东地区企业、生产单位和科研院所的联系和合作, 更好地为华东地区渔业生产服务, 华东地区上海水产大学等 20 余家单位于 2004 年 12 月 26 日在福建省福州市聚集, 对筹备成立中国水产学会鱼病研究会华东鱼类健康促进会进行了讨论, 大家取得一致意见, 倡议在 2005 年 10 月中国水产学会鱼病学专业委员会第六次会员代表大会暨国际学术讨论会在上海召开之际, 成立中国水产学会鱼病研究会华东鱼类健康促进分会, 形成辐射华东地区的联系网络和合作平台, 进一步加强华东地区广大鱼病学工作者的信息交流和技术合作, 提高华东地区鱼病控制技术水平。