

文章编号: 1000-0615(2003)06-0540-05

RAPD 分析野生和养殖三角帆蚌的遗传多样性

华 丹¹, 顾若波¹, 白云飞², 闻海波¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 东南大学分子与生物分子电子学教育部重点实验室, 江苏 南京 210076)

摘要: 用 150 个随机引物对野生三角帆蚌和养殖三角帆蚌进行随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析, 最终筛选出 20 个引物, 分别能扩增出 1~10 条大小不等的片段, 片段长度在 500~2 000bp 之间。野生三角帆蚌和养殖三角帆蚌的种内相似系数分别为 0.787 和 0.833, 显示野生种群基因组发生的变异较养殖种群大。野生三角帆蚌和养殖三角帆蚌种群间遗传距离为 0.054, 表明三角帆蚌野生和养殖种群亲缘关系比较接近。

关键词: 三角帆蚌; 野生种群; 养殖种群; 随机扩增多态 DNA; 遗传多样性

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

RAPD analysis of genetic diversity of wild and cultured *Hyriopsis cumingii*

HUA Dan¹, GU Ruo-bo¹, BAI Yun-fei², WEN Hai-bo¹

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics Certificated by Ministry of Education, Southeast University, Nanjing 210076, China)

Abstract: The genetic diversity of wild and cultured *Hyriopsis cumingii* was analysed using the random amplified polymorphism DNA (RAPD) technique. 20 random primers were sieved from 150 random primers, which could amplify 1 to 10 fragments individually with the fragment length varying from 500 to 2 000 bp. The intra-population genetic similarity of wild and cultured *Hyriopsis cumingii* is 0.787 and 0.833, respectively. It shows that gene variability in wild population is greater than that in cultured population. The inter-population genetic distance between wild and cultured *Hyriopsis cumingii* is 0.054. This means two populations of wild and cultured *Hyriopsis cumingii* have close relationship.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; wild population; cultured population; random amplified polymorphism DNA (RAPD); genetic diversity

RAPD 分子技术自 1990 年^[1-2]问世以来, 由于其操作简便、快速及多态性检出率高等独到的特点,

收稿日期: 2002-10-21

资助项目: 国家科技基础工作项目(我国水产种质资源数据库及网络建设子专题)资助

作者简介: 华 丹(1965-), 女, 江苏无锡人, 助理研究员, 主要从事淡水贝类及优质珍珠的研究。Tel: 0510-5559775, E-mail: mussel

@pub.wx.jsinfo.net 或 huad@ffrc.ac.cn

被广泛运用于农作物^[3]、家禽^[4]、鱼类^[5-6]、虾类^[7]等遗传多样性的分析。RAPD 技术成功运用于研究海水贝类的种群遗传特性^[8],在海水贝类方面,苏天凤等^[9]用 RAPD 技术对合浦珠母贝 3 个养殖群体的多态性及遗传结构进行了分析。Andre 等^[10]运用 RAPD 技术对幼贝进行物种分类。目前,用 RAPD 技术对淡水贝类的遗传多样性研究在国内尚未见报道。在国外,RAPD 技术用于淡水双壳类和螺类的研究已有报导^[11],特别是对淡水有害种斑马贝(*Dreissena polymorpha*)^[12]的研究较多。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国生产淡水珍珠的主要贝类^[13],产出的珍珠以其高品质而闻名全球。本文就三角帆蚌野生种群和养殖种群进行了 RAPD 分析,从分子水平探讨其遗传多样性及两个群体间的关系,以期对三角帆蚌的种质资源保护、育种以及遗传改良提供理论数据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

野生三角帆蚌采自太湖江苏省无锡五里湖段,壳长 13.5~15.8cm,壳高 6.8~7.6cm;养殖三角帆蚌来自江苏省无锡市滨湖区雪浪养殖场,壳长 9.5~11.8cm,壳高 4.6~5.5cm。

蛋白酶 K、Taq DNA 多聚酶、dNTPs 和随机引物等均购自上海生工生物工程公司,为加拿大 Sangon 公司的产品。

1.2 方法

1.2.1 贝类基因组 DNA 的提取及定量

贝类基因组 DNA 的提取和定量方法主要过程参照文献^[14]。最终稀释成浓度为 20ng·μL⁻¹的模板用于 RAPD 扩增。

1.2.2 RAPD 反应

参考 William^[1]的反应体系,进行了不同的 Mg²⁺ 浓度和不同模板浓度的扩增试验,对体系的反应条件进行了优化。从 150 条随机引物中筛选出 20 个引物(表 1)。

表 1 20 个随机引物的碱基序列

Tab.1 Sequence of 20 RAPD primers

引物 primers codes	序列(5' - 3') sequences	G + C (%)	引物 primers codes	序列(5' - 3') sequences	G + C (%)
S402	ACAACGCCTC	60	S223	CTCCCTGCAA	60
S412	GGGACGTTGG	70	S118	GAATCGGCCA	60
S420	AGGTCTTGGG	60	S404	GGCGGTTGTC	70
S218	GATGCCAGAC	60	S414	AGGGTCGTTC	60
S441	GGCACGTAAG	60	S236	ACACCCACACA	60
S184	CACCCCCTTG	70	S305	CCTTCCCTC	60
S184	CACCCCCTTG	70	S444	AAGTCCGCTC	60
S222	AGTCACTCCC	60	S408	TCTGTTCCCC	60
S157	CTACTGCCGT	60	S419	CCTTCAGGCA	60
S146	AAGACCCCTC	60	S240	CAGCATGGTC	60

RAPD 反应总体积为 25μL,其中包括 10 × PCR Buffer 2.5μL,2.0 mmol·L⁻¹ dNTP,0.2 mmol·L⁻¹ Mg²⁺,20 ng 引物,1.5U Taq 酶,20~50 ng DNA 模板。用 ddH₂O 定容至 25μL。

用 PCR 扩增仪(Perkin Elmer Thermal Cycler 480)进行扩增反应。程序为 95℃ 变性 2~5min;94℃ 1 min,36℃ 1 min,35~45 个循环;72℃ 1 min;最后 72℃ 延伸 7 min;4℃ 保温至关机。4℃ 冰箱保存。

1.2.3 电泳检测

将扩增产物以 λDNA/*Eco*I + *Hind* III 作为分子标记物,在 1.4% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。ImageMaster(r)VDS 紫外检测台上观察拍照。

1.2.4 数据处理分析

按每个样品扩增带的有无进行统计,有记为1,无记为0。按 Lynch^[15]方法计算种群相似系数和遗传距离。个体间相似系数: $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, 其中, n_{xy} 为个体 x 和 y 共有的扩增条带数, n_x 和 n_y 分别为个体 x 和 y 扩增条带数, 相似系数 S 为群体内所测各个体间相似系数的平均值。群体间相似系数: $S_{ij} = 1 + S'_{ij} - 0.5(S_i + S_j)$, 其中 S_i 和 S_j 分别为群体 i 和 j 的种内相似系数值, S'_{ij} 为群体 i 和 j 之间两个随机个体相似系数的平均值。群体间遗传距离: $D'_{ij} = -\text{Ln}(S'_{ij} / \sqrt{S_i S_j})$ 。

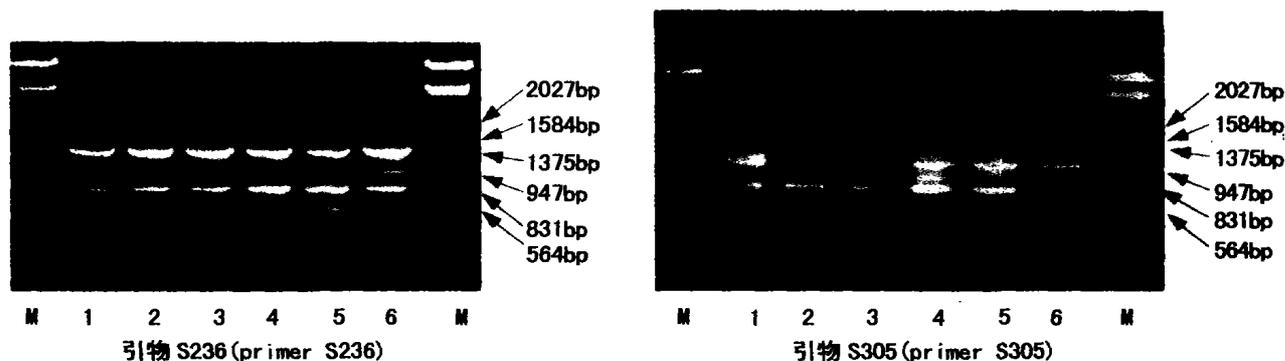


图1 三角帆蚌 RAPD 扩增电泳图谱

Fig.1 RAPD bands of *H. cumingii*

M: λ DNA / *Eco*R1 + *Hind*III, 1~3: 野生三角帆蚌; 4~6: 养殖三角帆蚌

1~3: wild *H. cumingii*; 4~6: cultured *H. cumingii*

2 结果

实验用 150 条随机引物对不同群体的三角帆蚌, 进行 RAPD 分析, 最终筛选出 20 条引物, 分别能扩增出 1~10 条片段, 长度大部分在 500~2 000 bp 之间。平均每个引物扩增 1~7 个片段。图 1 为 RAPD 扩增电泳图谱。上图为引物 S236 RAPD 扩增电泳图谱, 下图为引物 S305 RAPD 扩增电泳图谱。

根据 20 个引物的电泳结果的统计分析, 得出三角帆蚌野生和养殖群体内和群体间的相似系数和群体间相对遗传距离(表 2)。野生三角帆蚌和养殖三角帆蚌的种内相似系数分别为 0.787 和 0.833, 显示野生种群基因组发生的变异较养殖种群大。野生三角帆蚌和养殖三角帆蚌种群间遗传距离为 0.054, 表明三角帆蚌野生和养殖种群亲缘关系比较接近。

3 讨论

表 1 中的 20 个引物都能检出 1~10 条明显的扩增带, 呈多态性。图 1 为引物 S236 和 S305 的扩增产物, 两群体有共有带和多态带, 不同引物扩增出的片段不同, 引物 S236 的扩增片段 1000bp 和引物 S305 的扩增片段 500bp, 1000bp, 1100bp 呈现出多态性, 表明这两种群体在基因组结构上存在差异。引物 S236 的扩增片段 1480bp, 831bp 和引物 S305 的扩增片段 700bp 都呈现共有带, 表明虽然不同群体间的条带不同, 但两种群体在基因组结构上差异不是特别明显, 这可能是由于两群体的样本在地理位置上比较接近, 从而使得遗传差异不太明显。

表 2 群体内和群体间相似系数及群体间相对遗传距离

Tab.2 Intra and inter-population genetic similarity and genetic distance

	CH	WH
CH	0.833	0.946
WH	0.054	0.787

注: CH 为养殖的三角帆蚌, WH 为野生的三角帆蚌, 对角线上的数字为群体内相似系数, 对角线上方数字为群体间相似系数, 对角线下方数字为群体间遗传距离

Notes: CH means cultured *H. cumingii*, WH means wild *H. cumingii*, values on the diagonal are intra-population similarity, values above diagonal are inter-population similarity, values under diagonal are genetic distance

这与刘必谦等^[16]在研究4个不同地区的大连湾牡蛎的遗传多样性的结果一致。这结果在育种生产上有重要的意义,选择亲本时,尽可能选取地理位置相距较远的父本和母本作为亲本,以保证其遗传多样性,避免由于近源繁殖而引起的种质性状退化,抗病能力下降,生长速度减慢,性成熟提早,从而造成珍珠质量和产量降低。

RAPD分析结果显示(表2),三角帆蚌养殖群体内的相似系数为0.833,大于野生群体内的相似系数0.787,也即野生群体的遗传多样性较为丰富,这说明由于进行人工养殖而使得三角帆蚌的遗传多样性有所下降。究其因,可能与人工养殖水体的环境单一、饵料生物品种相同等因素有关。王爱民等^[17]对马氏珠母贝的野生群体和养殖群体进行了RAPD分析,同样得出野生群体的遗传多样性高于养殖群体。遗传多样性的减少很可能影响贝类的繁殖与生长,及对环境的适应性。所以,在进行三角帆蚌的人工繁殖时,应选取野生贝类作为亲本,以保证种质的优良性状。

三角帆蚌养殖群体和野生群体间的相似系数为0.946,遗传距离较小为0.054,表明两群体的亲缘关系比较接近,人工养殖群体的遗传多样性并未显著降低。这是由于,实验用的三角帆蚌养殖群体为野生亲贝的子一代,所以在遗传性状上改变不多。庄志猛等^[18]对野生和养殖对虾群体进行了遗传多样性研究,认为尽管来自野生亲本的子一代养殖群体的遗传多样性改变不多,但人工累代繁殖体系会导致后代基因库发生不良变化,从而引起群体生长缓慢、抗逆性差等后果。所以,在进行三角帆蚌的繁殖及珍珠养殖生产中,除了选择野生的远源亲本外,必须对三角帆蚌的种质资源进行保护。建立种质资源保护区及保种地,这对合理利用资源、保护和保存经济原种的优良性状和种质、避免幼贝生产过程中种质混杂和退化是十分必要的。

运用RAPD技术分析三角帆蚌的野生群体和养殖群体的遗传结构和遗传多样性,得出地理位置较接近的这两种群体的遗传多样性差异不太明显,野生种群与其子一代养殖群体的亲缘关系比较接近,野生种群较养殖群体表现出更多的遗传多样性。这些结果为三角帆蚌的苗种培育、品种改良及种质资源保护提供了理论依据。

参考文献:

- [1] William J G, Kubelik A R, Livak, K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531 - 6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213 - 7218.
- [3] Gao M G, Yang K C, Zhang H Y. RAPD analysis of Sichuan maize in bred lines and hybrids [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 2002, 20(2): 96 - 99. [高明刚, 杨克诚, 张怀渝. 四川部分玉米强优势组合及其亲本自交系的 RAPD 分析 [J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(2): 96 - 99.]
- [4] Go J, Wu H H, Shu X F, et al. Study on population genetic relationships among Jiangxi native chicken breeds by RAPD analysis [J]. *Hereditas*, 2001, 23(04): 301 - 305. [高军, 吾豪华, 舒希凡, 等. 江西省主要地方鸡种的 RAPD 分析及其群体遗传关系的研究 [J]. 遗传, 2001, 23(04): 301 - 305.]
- [5] Naish A, Warren M, Bardakci F, et al. Use of DNA fingerprinting, RAPD and RAPD/RFLP markers for estimating variation between aquacultural strains of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquac*, 1995, 137: 48 - 49.
- [6] Jia H B, Zhou L, Gui J F. RAPD marker analysis of two artificial gynogenetic populations in red-white ornamental carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(1): 1 - 5. [贾海波, 周莉, 桂建芳. 两个人工雌核发育红白锦鲤群体的 RAPD 标记分析 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(1): 1 - 5.]
- [7] Liu P, Meng X H, Kong J, et al. RAPD analysis of genetic markers affiliated with disease resistant trait in shrimp [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(3): 270 - 274. [刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析 [J]. 水产学报, 2002, 26(3): 270 - 274.]
- [8] Li H L, Song L S, Liu B Z, et al. Study on the genetic structure of different population of *Chlamys farreri* and their hybrids heterosis [J]. *Oceanol et Limnol Sin*, 2002, 33(2): 188 - 195. [李红蕾, 宋林生, 刘保忠, 等. 栉孔扇贝不同种群的遗传结构及其杂种优势 [J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 188 - 195.]
- [9] Su T F, Cai Y C, Zhang D C, et al. RAPD analysis of three cultured populations of *Pinctada martensii* [J]. *J Fish Sci China*, 2001, 9(2): 106 - 109. [苏天凤, 蔡云川, 张殿昌, 等. 合浦珠母贝的3个养殖群体的 RAPD 分析 [J]. 中国水产科学, 2001, 9(2): 106 - 109.]

- [10] Andre C, Lindegarth M, Jonsson P R, *et al.* Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. Lamarcki*[J]. J Mar Biol Association of the United Kingdom, 1999, 79: 563 - 565.
- [11] Vernon J G, Jones C S, Noble L R. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal cross-fertilization in *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora)[J]. Journal of Molluscan Studies, 1995, 61(4): 455 - 465.
- [12] Stepien C A, Morton B, Dabrowska K A, *et al.* Genetic diversity and evolutionary relationships of the troglodytic "living fossil" *Congeria kusceri* (Bivalvia: Dreissenidae)[J]. Molecular Ecology, 2001, (10): 1873 - 1879.
- [13] Hua D, Gu R B. Freshwater pearl culture and production in China[J]. Aquaculture Asia, 2002, 7(1): 6 - 8.
- [14] Jin D Y, Li M F. Molecular cloning[M]. Beijing: Science Press, 1996. 464 - 467. [金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 464 - 467.]
- [15] Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting[A]. Burke T, Dolf G, Jeffreys A J: DNA fingerprinting approaches and applications[C]. 1990, 80: 113 - 126.
- [16] Liu B Q, Dia J X, Yu Z N. Application of RAPD markers in the study of *Ostrea talienuhanensis* population [J]. J Ocean Univ Qingdao, 1998, 28(1): 82 - 88. [刘必谦, 戴继勋, 喻子牛. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的运用[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 82 - 88.]
- [17] Wang A M, Deng F J, Zhang X Y, *et al.* Analysis on genetic diversity of *Pinctada martensii* Dunker [J]. J Wuhan Univ (Nature Science), 2002, 46(4): 467 - 470. [王爱民, 邓凤姣, 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), 2002, 46(4): 467 - 470.]
- [18] Zhang Z M, Kong J, Shi T, *et al.* Genetic diversity in the wild population and hatchery stock of *Penaeus japonicus* shrimp by isoenzyme analysis [J]. Advances in Natural Science, 2001, 11: 250 - 255. [庄志猛, 孔杰, 石拓, 等. 日本对虾野生和养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 自然科学进展, 2001, 11: 250 - 255.]