

人工育珠对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*) 遗传基因影响的初步研究*

杨品红^{1, 2, 3} 王志陶¹

(1. 湖南文理学院生命科学院 常德 415000; 2. 湖南省水产工程技术研究中心 常德 415000;
3. 大湖水殖股份有限公司 常德 415000)

摘要 采用酚-氯仿和试剂盒两种提取法对三角帆蚌怀珠群与非怀珠群各 6 个个体进行基因组 DNA 的提取, 然后在优化 RAPD(随机扩增多态性 DNA)检测条件基础上, 从 80 个随机引物中筛选出 12 个扩增较好且多态性强的引物进行 RAPD 扩增, 产物通过水平板琼脂糖凝胶电泳和垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳两种方法进行检验并对 DNA 的多态性进行分析。结果显示在怀珠群和非怀珠群检测到的位点数、多态位点比例、平均 Shannon 多态性信息指数、平均 Nei's 基因多样性指数、群体内个体间平均遗传相似率和平均遗传距离分别为 100、33%、0.1927、0.1324、0.904、0.096、95、47.37%、0.2711、0.1879、0.861、0.139, 群体间的平均遗传距离为 0.821, 非怀珠群的变异性大于怀珠群; 本研究还获得了两群体各自的特异扩增谱带及两群体间表达差异较大谱带, 这些位点很可能是由人工育珠所引起。根据 MEGA4.0 软件的 UPGMA 和 NJ 程序构建的分子系统树可直观地将两群体分开。

关键词 三角帆蚌, 人工育珠, 随机扩增多态性 DNA(RAPD), 遗传多样性

中图分类号 Q3

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)又称“劈蚌”、“江蚌”, 属于软体动物门(Phylum Mollusca)、瓣鳃纲(双壳纲)(Class Lamellibranchia)、真瓣鳃目(Order Eulamellibranchia)、蚌科(Family Vnimitidae)。主要栖息于我国山东、河北、安徽、江苏、江西、湖南、湖北、浙江等地, 尤以湖南省洞庭湖地区以及中型湖泊分布较多。该物种是我国特有的河蚌资源, 又是育珠的好材料, 湖南省三角帆蚌资源虽然较丰富, 但随着珍珠养殖业的发展, 该蚌的捕捞量猛增, 导致天然资源衰退(钱名全, 2004)。鱼、虾、贝类的养殖群体往往由于人为因素的干扰, 导致群体遗传多样性水平下降, 进而导致生长率、抗病性和繁殖力等性能下降, 甚至危及种群的生存。

随机扩增多态 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)是建立在 PCR 技术基础上检测 DNA 序列多态性和建立分子遗传标记的技术, 它是

由 Williams 等(1990)、Welsh 等(1991)同时运用随机引物扩增寻找多态 DNA 片段作为分子遗传标记, 具有简便、准确、快速、灵敏的特点, 既有大量的随机引物可供选择, 又不受种属的限制, 因此被广泛的应用于物种及种群的鉴定、亲缘关系的探讨、基因定位、遗传多样性分析、构建遗传图谱、分类学和农牧业的遗传育种等方面的研究(杨品红等, 2007; 杨慧荣等, 2006; 周莉等, 1998; 龙良启等, 2000; 张四明等, 2000; 颜金鹏等, 2005), 对于野生品种及养殖品种遗传多样性的对比研究已较深入(李凌云等, 2004; 张全启等, 2004; 尹绍武等, 2007), 对贝类遗传多样性的 RAPD 分析也在不断的深入(杜晓东等, 2004; 丁小雷等, 2003; 么宗利等, 2005; 宋林生等, 2002; 李莉等, 2006; 李太武等, 2003), Wei 等(2006)通过 RAPD 分析研究了位于湖北、河南的五种淡水无齿蚌的遗传多样性, 华丹等(2003)对太湖野生和养殖三角帆蚌进行了

* 湖南省杰出青年基金资助, 041002 号; 国家星火计划资助, 2006EA770019 号; 湖南省“十一五”重点建设学科“动物学”资助, 07-A-2 号。杨品红, 博士, 教授, E-mail: ypkings@263.net

收稿日期: 2009-02-19, 收修改稿日期: 2009-05-13

RAPD 分析, 并得出野生种群基因发生的变异较养殖种群大, 此外李家乐等(2005)和汪桂玲等(2007)分别对五大湖三角帆蚌群体遗传多样性进行了 RAPD 和 SSR 分析。但是对三角帆蚌怀珠与非怀珠条件下免疫性及调控机理以及人工育珠是否诱发基因突变(可提高群体遗传多样性)等方面的研究却未见报道。本研究通过对怀珠蚌群体和非怀珠蚌群体进行 RAPD 分析, 研究其遗传背景, 以期从 DNA 水平丰富三角帆蚌的遗传资料现状, 为其种质资源的合理利用和保护提供依据, 促进淡水育珠产业化的健康和可持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验中所用的三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*), 均来源于同一水域——湖南省常德地区的西洞庭湖。其中人工育蚌珠(简称怀珠蚌)是用西洞庭湖中的原种蚌育成 F_1 后, 进行人工植珠, 再以产珠性能为指标进行选育, 为 F_3 代群体。原种蚌(简称非怀珠蚌)是西洞庭湖中的野生蚌, 且没有进行人工植片育珠的群体。各随机抽取 6 只, 暂养 48h, 杀蚌, 立即取闭壳肌贮于无水乙醇中 -20°C 冰箱中保存。

1.2 基因组 DNA 的提取及模板筛选

采用酚-氯仿提取法(Sambrook *et al.*, 1989)和 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒两种方法提取基因组 DNA, 各蚌均挑选经电泳检测结果较好、紫外分光光度仪检测结果中 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 左右的样品一个构成 PAPPD 的模板库(怀珠蚌 6 个, 原种蚌 6 个), 并将各模板稀释成终浓度为 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右, 4°C 保存。

1.3 RAPD-PCR 反应

用 80 个随机引物进行 RAPD 扩增, 从中选出重复性好, 图谱清晰, 扩增条带数较多且多态性强的 12 个随机引物用于后续实验, RAPD 反应体系与扩增程序: 使用高保真即用 PCR 扩增试剂盒, RAPD 反应总体积为 $20\mu\text{l}$, 其中 $2\times\text{HiFi-PCR Master}$ (内含 $3\text{mmol}/\text{L}$ MgCl_2 , $0.2\text{mmol}/\text{L}$ dNTP, $0.1\text{U}/\text{L}$ pfu DNA 聚合酶和 $2\times\text{PCR}$ 缓冲液) $10\mu\text{l}$ 引物($20\mu\text{M}/\text{L}$) $1\mu\text{l}$, 模板 DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) $2\mu\text{l}$, MgCl_2 ($25\text{mmol}/\text{L}$) $0.8\mu\text{l}$, 用 ddH_2O 补足 $20\mu\text{l}$ 反应体系, 每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。采用 Techen Ltd. Duxford cambridge UK 生产的 110936-4 型 PCR 仪扩增, 扩增程序为: 95°C 预变性 5min , 然后进行 35 个循环(每个循环包括 94°C 变性 1min 38°C 退火 1min 72°C 延伸 1min), 最后 72°C

延伸 7min , 反应结束后 4°C 保温。所有药品均购于上海生物工程技术服务有限公司。

1.4 RAPD 产物电泳分析

采用琼脂糖凝胶电泳($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭染色)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(DNA 银染)两种电泳方法对 RAPD 产物进行分离, 然后在凝胶成像系统中检测并拍照。其中 DNA 银染方法参照 Bassam 等(1991)的方法稍有改进。

1.5 数据分析

用 Gel-Pro 软件(Medie Cyberretics, USA)分析获得的 RAPD 电泳图谱, 由个体之间 DNA 序列差异而产生多态性可用双等位座系统来解释, 即假定凝胶上迁移位置相同的所有条带均来自同一位点上的同一等位基因, 按每个座位上相应谱带的存在或缺失转化为 0、1 矩阵(1 表示出现扩增条带, 0 表示未出现扩增条带, 统计时仅记录清晰稳定的扩增条带)统计位点总数和多态位点比例, 按如下公式计算: 多态位点比例(P) = 多态位点数/总位点数 $\times 100\%$ 。利用 Popgene 1.32 版软件(Yeh *et al.*, 1991)计算 Nei's 基因多样性指数(H_e) (Nei, 1978)和 Shannon 信息指数(Shannon information index) (林从容等, 1998)。

$$\text{Nei 氏基因多样性指数 } H_e = \frac{\sum(1 - \sum P_i^2)}{N}$$

式中, P_i 为单个位点上的等位基因频率, N 为所检测到的位点数。

$$\text{Shannon 信息指数 } H_o = - \frac{\sum P_i \ln P_i}{N}$$

式中, P_i 为第 i 条扩增条带存在的频率, N 为所检测到的位点数。

任意两个体间的遗传相似度按照 Lynch(1990)提出的相似率公式: $S_{xy} = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 计算(N_{xy} 是个体 x 和 y 的共有条带数, N_x 和 N_y 分别是个体 x 和 y 扩增的扩增带数)。群体内或群体间的所有个体间的遗传相似度 S 和遗传距离 D 值简单平均而求得。最后根据 12 个个体间的遗传距离, 个体间和两个群体间相互关系分支图经 MEGA4.0 软件(Tamura *et al.*, 2007)的类平均聚类法(unweighed pair-group method of analysis, UPGMA)和邻位法(neighbor joining, NJ)构建聚类关系图。

2 结果与分析

2.1 两种基因组 DNA 提取方法的比较

酚-氯仿和试剂盒两种提取法提取基因组 DNA

琼脂糖凝胶电泳检测发现前者提取的样品 DNA 的量较后者多, 但质量稍低于后者。

2.2 RAPD 扩增结果

2.2.1 怀珠蚌与非怀珠蚌扩增谱带 在 12 个引物扩增产生的 RAPD 图谱中, 引物 S64 和引物 S21 检测到了两群体各自的特异性谱带: 在引物 S64(图 1)中扩增出了一条特异于非怀珠群的大小约为 450bp 的

谱带, 在引物 S21(图 2)中扩增出了一条特异于怀珠群的长度约为 820bp 的谱带。此外还发现了一些在两群体间表达差异较大谱带: 如在引物 S64、S53、S402 和 S78 中分别检测到了长度为 1030bp、1600bp、580bp、980bp 和 510bp 的 DNA 片段(图 1), 且均表现为在怀珠群所有个体中都表达, 而在非怀珠群中却仅有少部分个体表达。

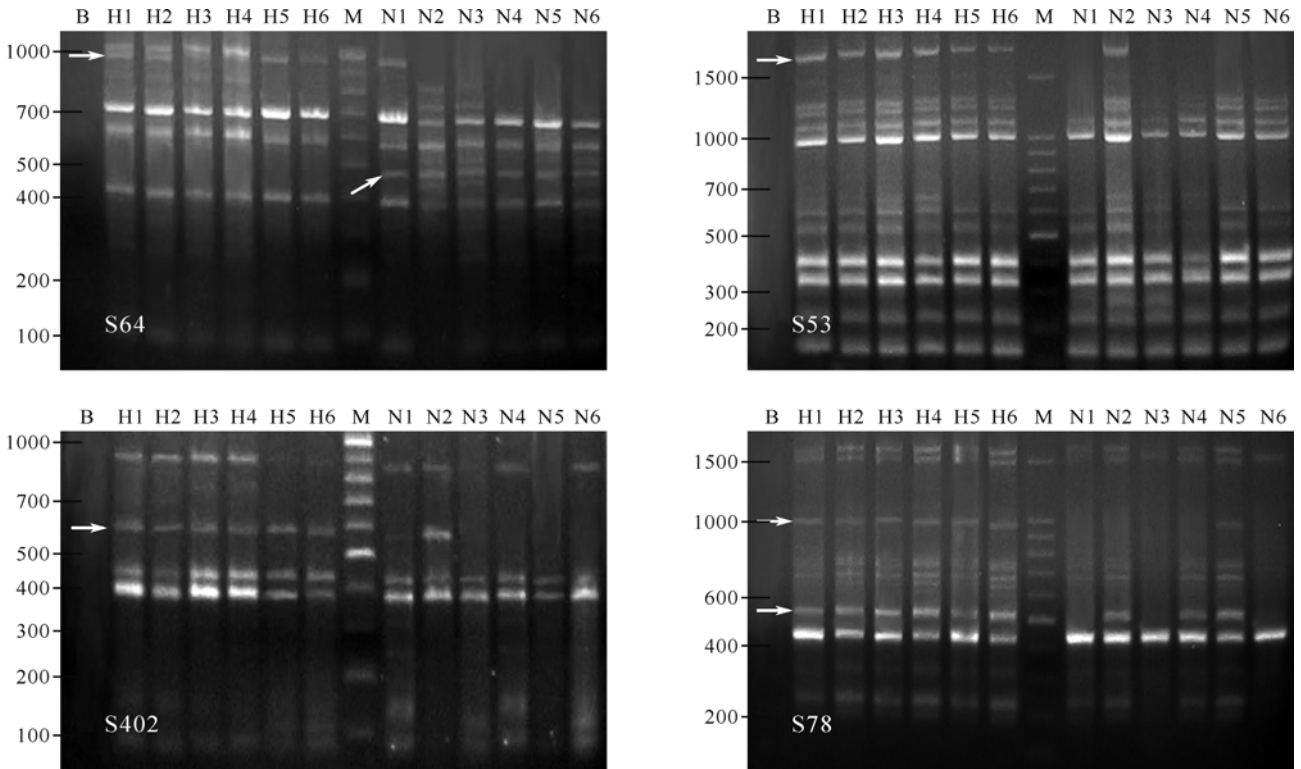


图 1 引物 S64、S53、S402、S78 在育珠蚌和非育珠蚌的 RAPD 扩增琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 The RAPD patterns of pearl-bread *H. cumingii* and non-pearl-bread *H. cumingii* using primers S64, S53, S402, and S78
注: H1—H6 为 6 个育珠蚌个体, N1—N6 为 6 个非育珠蚌个体; M: DNA/Hind Marker, B 表示空白对照, → 表示该 DNA 片段在两群体间具有较大的表达差异, ↗ 表示群体内的特异 DNA 片段。图 2 同

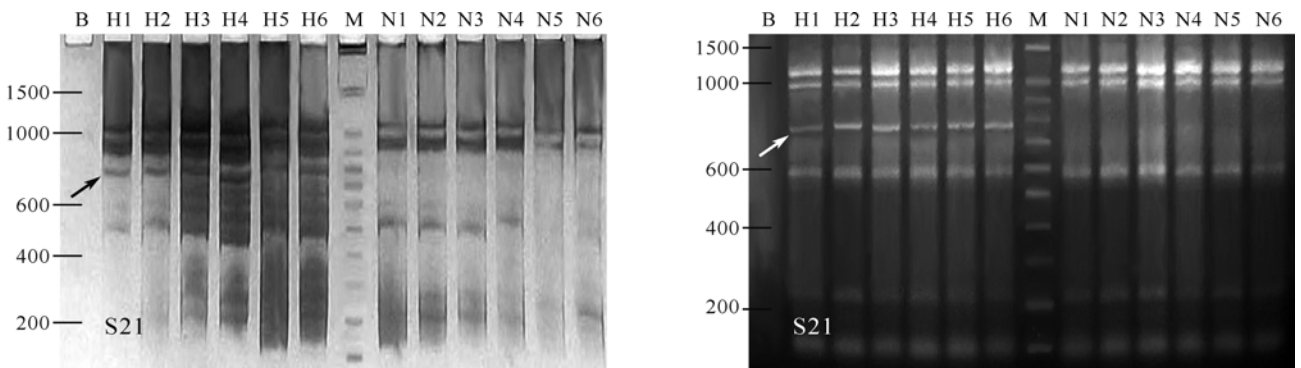


图 2 引物 S21 对育珠和非育珠三角帆蚌 RAPD 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测结果(左)和琼脂糖凝胶电泳 EB 染色结果(右)

Fig.2 RAPD patterns of pearl-bread *H. cumingii* and non-pearl-bread *H. cumingii* using primer S21 by horizontal agarose gel (left) and vertical polyacrylamide gel (right) methods

2.2.2 RAPD 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳的比较 利用建立的尿素-聚丙烯酰胺凝胶银染快速检测技术检测 RAPD 的扩增产物, 用银染检测同一引物 S21 在怀珠蚌和非怀珠蚌中扩增谱带数和多态位分别为 10、6 和 6、3 而经琼脂糖 EB 染色电泳, 其扩增谱带数和多态位分别为 6、5 和 1、1(图 2), 可见尿素-聚丙烯酰胺凝胶的灵敏度高于琼脂糖凝胶电泳, 对于多态性不丰富的品种会产生更丰富的多态性。

2.2.3 RAPD 扩增结果分析 在育珠与非育珠蚌群中共扩增出 967 条带, 育珠群和非育珠群分别扩增出 502 条和 465 条带, 所有的条带在 0.1kb 到 2kb 之间, 平均每个引物扩增出 80.5 条带。在育珠蚌群中共检测到的位点数为 100, 其中多态位点数为 33, 多态位点比例为 33%, Shannon 信息指数为 0.1927 ± 0.2856 , Nei's 基因多样性指数为 0.1324 ± 0.1990 , 在非育珠蚌群中共检测到的位点数为 95, 其中多态位点数为 45, 多态位点比例为 47.37%, 平均 Shannon 信息指数为 0.2711, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.1879(表 1)。

2.2.4 遗传多样性 从表 2 和表 3 可见, 怀珠蚌群个体之间的遗传相似性在 0.862—0.943 之间, 平均遗传相似度为 0.904, 遗传距离在 0.057—0.138 之间,

平均遗传距离为 0.096; 非怀珠蚌群个体之间的遗传相似度在 0.828—0.922 之间, 平均遗传相似度为 0.861, 遗传距离在 0.078—0.172 之间, 平均遗传距离为 0.139; 两群体间的遗传相似度在 0.739—0.901 之间, 平均遗传相似度为 0.821, 遗传距离在 0.089—0.261 之间, 平均遗传距离为 0.821。

2.2.5 聚类分析 将 12 个个体间的遗传距离(表 2)输入计算机分别用 MEGA4.0 软件的 UPGMA 程序和 NJ 程序进行聚类分析, 两种方法中怀珠蚌群 6 个个体均能较先聚成一个分支(图 3), 并且均表现为 H3 与 H4, H5 与 H6 先聚在一起, 然后由其聚成的整体与 H1 和 H2 聚成一支; 非怀珠蚌群的聚类结果在两种方法中稍有差别, 但均表现为 N2、N5 和 N6 三个个体先聚为一支。在 UPGMA 法中该分支较先与本群的其它个体聚为一支从而明显的与怀珠蚌群区分开, 但在 NJ 法中该分支与怀珠蚌群较先聚类。从整体来看, 通过分支系统数能将怀珠蚌群与非怀珠蚌群分开。

3 讨论

对动物基因组 DNA 的提取, 试剂盒法具有简单、快速、安全(不需用饱和酚进行抽提, 饱和酚具有极强的腐蚀性)等优点, 但是造价较高, 而常规的酚-氯仿提取法则造价较低且提取的 DNA 量较大, 但质量稍

表 1 12 组引物组合分别在育珠蚌和非育珠蚌中检测到的位点数、多态位点数、Shannon 信息指数和 Nei's 基因多样性指数
Tab.1 The number of loci, polymorphic loci, Shannon information index and Nei's genetic diversity index amplified within two *H. cumingii* groups different in pearl-bread with 12 primer pairs

引物	序列(5'-3')	位点数		多态位点数		Shannon 信息指数		Nei's 基因多样性指数	
		H	N	H	N	H	N	H	N
S64	CCGCATCTAC	10	10	7	8	0.4270	0.4591	0.2977	0.3111
S53	CAGTTCACGG	13	13	1	7	0.0490	0.3346	0.0342	0.2393
S4	GGA CTGGAGT	10	9	3	7	0.1594	0.4569	0.1056	0.3222
S155	GAACGGACTC	7	8	2	5	0.1359	0.3817	0.0903	0.2639
S86	CACACTGGAG	6	6	1	1	0.1061	0.1155	0.0741	0.0833
S21	CAGGCCCTTC	10	6	6	3	0.3560	0.1724	0.2444	0.1167
S25	TCTGGACGGA	7	8	2	4	0.1900	0.3452	0.1349	0.2381
S78	TGAGTGGGTG	11	9	3	4	0.1398	0.2249	0.0909	0.1560
S164	AAAGCTGCG	7	7	1	0	0.0966	0.0000	0.0690	0.0000
S144	ACAGGATCAG	8	9	2	1	0.1271	0.0501	0.0864	0.0309
S402	ACAACGCCTC	4	4	1	2	0.1733	0.3183	0.1250	0.2222
S28	CAGGCCCTTC	7	7	4	3	0.3880	0.2809	0.2118	0.1984
	合计	100	95	33	45	2.3482	3.1396	1.5643	2.0821
	平均数	—	—	—	—	0.1927	0.2711	0.1324	0.1879
	多态位点比例(%)	—	—	33	47.37	—	—	—	—

表 2 怀珠与非怀珠三角帆蚌 12 个个体的遗传相似度(右上角)和遗传距离(左下角)

Tab.2 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between the twelve individuals of two *H. cumingii* groups different in pearl-bread

个体	H1	H2	H3	H4	H5	H6	N1	N2	N3	N4	N5	N6
H1	—	0.892	0.862	0.885	0.877	0.877	0.844	0.865	0.787	0.829	0.853	0.834
H2	0.108	—	0.910	0.890	0.896	0.906	0.877	0.899	0.797	0.850	0.882	0.843
H3	0.138	0.090	—	0.960	0.898	0.897	0.819	0.901	0.802	0.854	0.862	0.822
H4	0.115	0.115	0.040	—	0.938	0.923	0.845	0.857	0.803	0.843	0.888	0.861
H5	0.123	0.104	0.102	0.062	—	0.943	0.848	0.826	0.803	0.859	0.868	0.811
H6	0.123	0.094	0.103	0.077	0.057	—	0.861	0.874	0.779	0.833	0.867	0.826
N1	0.156	0.123	0.181	0.155	0.152	0.139	—	0.868	0.836	0.878	0.835	0.830
N2	0.156	0.101	0.099	0.143	0.174	0.126	0.132	—	0.889	0.866	0.920	0.859
N3	0.213	0.203	0.198	0.197	0.197	0.221	0.164	0.111	—	0.875	0.844	0.839
N4	0.171	0.150	0.146	0.157	0.141	0.167	0.122	0.134	0.125	—	0.859	0.828
N5	0.147	0.118	0.138	0.112	0.132	0.133	0.165	0.080	0.156	0.141	—	0.890
N6	0.166	0.157	0.178	0.139	0.189	0.174	0.170	0.141	0.161	0.172	0.110	—

表 3 怀珠与非怀珠蚌群群体内与群体间的平均遗传距离

Tab.3 The mean genetic identity (above diagonal) and genetic distance between two groups of *H. cumingii*

项目	遗传相似度(平均值±标准差)		遗传距离(平均值±标准差)	
	育珠群	非育珠群	育珠群	非育珠群
育珠群	0.904±0.027	—	0.096±0.027	0.179±0.031
非育珠群	0.821±0.031	0.861±0.026	—	0.139±0.026

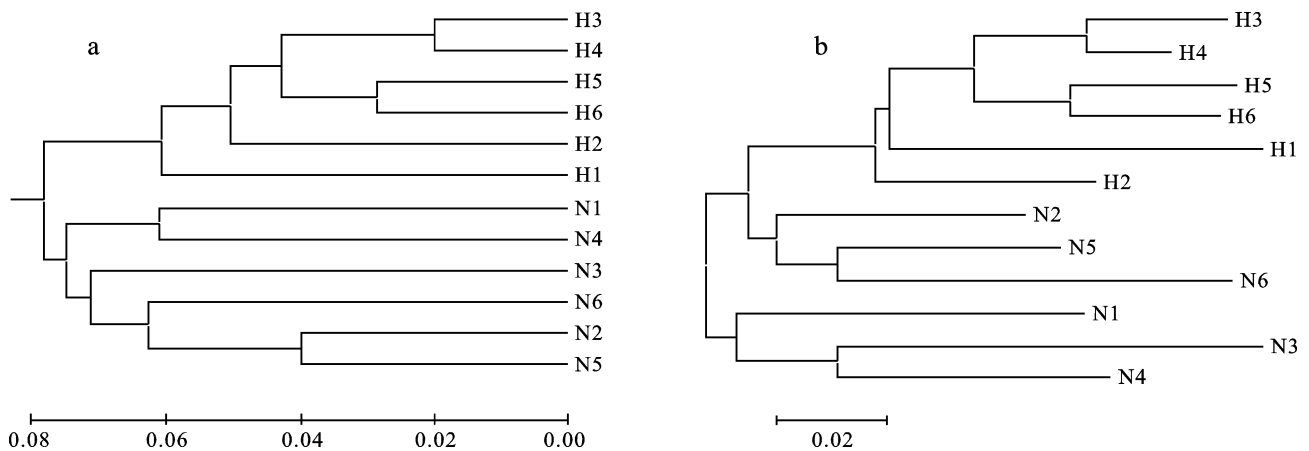


图 3 用类平均聚类法(左)和邻位法(右)构建的怀珠与非怀珠蚌群的聚类关系图

Fig.3 The UPGMA (left) and NJ(right) dendrogram showing relationships among *H. cumingii*

低于前者, 本实验通过两种方法进行对比研究发现两种方法对三角帆蚌而言, 均能获得较纯的 DNA。

对 RAPD 产物通过琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳两种方法进行检测, 所得结果进一步验证了尿素-聚丙烯酰胺凝胶的灵敏度高于琼脂糖凝胶电泳, 对于多态性不丰富的品种会产生更丰富的多态性。本实验中用琼脂糖凝胶电泳也能检测到较丰富的多态位, 故以该种电泳为主。

遗传多样性是每种生物所固有的特性, 它是长期适应环境与进化的产物, 遗传多样性越高则意味着适应生存能力越强, 蕴涵着比较丰富的育种和遗传改良能力, 遗传多样性的最普通评价标准是杂合度, 等位基因多样性及多态座位的比例(Nei *et al*, 1975), 此外利用 shannon 多样性指数可以分析群体内和群体间的遗传多样性, 从而揭示遗传变异在群体内和群体间的分布。

目前基于基因或基因组差异的分子标记技术对物种进行的鉴定是最为准确和可靠的。已经发展起来的分子标记有多种,包括 RFLPs、SSRs、ISSRs 和 RAPD 标记技术,但像 RFLPs、SSRs 等分子标记的筛选过程非常昂贵,除耗时耗力外对设备的要求也高,相比较而言 RAPD 无疑是经济可行的,RAPD 标记符合孟德尔遗传相符,但由于其扩增产物为显性标记,只能检测一对等位基因有无,无法鉴别纯分子和杂分子的差异。因此,一般在进行数据处理时都是将有一扩增产物片段作为一个遗传位点来分析的,周泽杨等(1998)研究表明,当进行遗传差异研究时,当所分析的 RAPD 分子位点数达到 70 时才能获得比较稳定可靠的统计信息,本文针对群差异研究所分析的位点数分别为 100 和 95,可知获得的结果是可靠的,根据 Tajima(1983)的 RAPD 序列抽样分布理论,在 DNA 水平上估计群体变异时,样本数量 $N=10$ (甚至 5)就能反映群体水平,本研究从怀珠蚌群体和非怀珠蚌群体中分别只随机选取了 6 个个体,通过 RAPD 技术分析,结果显示在怀珠群和非怀珠群检测到的位点数、多态位点比例、平均 Shannon 多态性信息指数、平均 Nei's 基因多样性指数、群体内个体间平均遗传相似率和平均遗传距离分别为 100、33%、0.1927、0.1324、0.904、0.096、95、47.37%、0.2711、0.1879、0.861、0.139,群体间的平均遗传距离为 0.821,非怀珠群的变异性大于怀珠群,此外非怀珠群的群体内个体间平均遗传相似率为 0.861 ± 0.026 (表 3),大于华丹等(2003)对太湖野生三角帆蚌进行的 RAPD 分析结果(0.787)而与 Wei 等(2006)研究位于湖北、河南的五种淡水无齿蚌的遗传多样性较接近(*A. a. flavotincta* = 0.8482, *A. w. woodiana* = 0.8536, *A. arcaeiformis* = 0.8266, *A. fluminea* = 0.8614, *A. W. picifica* = 0.8517),表明非怀珠群仍具有较高的遗传多样性。怀珠群体的个体间平均遗传相似率为 0.904 ± 0.027 ,与华丹等(2003)所得的 0.833 相差较大,认为这种差异很明显是由人工选育造成的。即人工选育减少了物种的遗传基因的多样性。从聚类分析上看:12 个个体间的遗传距离经 MEGA4.0 软件的聚类分析非怀珠群中的 N2、N5 和 N6 三个个体聚成的一支在 NJ 法中该分支与怀珠蚌群较先聚类,表明这些个体与怀珠蚌群有较高的相似度,究其原因是由取样造成的误差还是由于怀珠诱发的基因突变还是另有它因还有待进一步研究。同时,此次实验结果显示,虽然来自同一水域的三角帆蚌,但经过三代育珠后,其 F_3 育珠蚌与

原水域中的原种蚌其基因组存在明显差异,作者认为,实验中获得的两群体各自的特异扩增谱带及两群体间表达差异较大谱带所在的位点很可能是与育珠性能相关的功能基因位点。这些点位的出现,可能是因为育珠而诱发的机体基因突变,或者是具有较好育珠性能的三角帆蚌所具有的一些基因。这是因为,作者在选育三角帆蚌时,主要选择其怀珠量大的蚌做亲本。对于育珠是否诱发机体基因突变这个问题目前还不能确定,在后续工作中,将会对育珠三角帆蚌进行核型分析,然后与已研究获得的非育珠三角帆蚌核型(杨品红等,2008)进行对比分析,以及对其线粒体 DNA 的 *cyt b* 进行测序并加以对比分析,进一步探讨此问题。在此基础上,再进一步利用基因敲除技术探讨这些基因的功能,并对与育珠相关的功能基因位点进行定位,将对淡水育珠产业的发展具有重要意义。

参 考 文 献

- 丁小雷,邓凤娇,王爱民等,2003. 野生马氏珠母贝子一代的遗传多样性. 动物学杂志, 38(1): 2—7
- 么宗利,周 凯,来琦芳等,2005. 我国 5 个青蛤地理群体遗传变异 RAPD 分析. 海洋渔业, 27(2): 102—108
- 尹绍武,冯永勤,黄 海等,2007. 方斑东风螺 2 个养殖群体遗传变异的 RAPD 分析. 中国水产科学, 14(4): 667—671
- 龙良启,赵振山,汤保贵等,2000. 泥鳅与大鳞泥鳅正反交子代遗传变异的 RAPD 分析. 水生生物学报, 24(6): 659—662
- 华 丹,顾若波,白云飞等,2003. RAPD 分析野生和养殖三角帆蚌的遗传多样性. 水产学报, 2(6): 540—544
- 杜晓东,邓岳文,叶富良等,2004. 广东和广西地区野生文蛤的遗传多样性. 中国水产科学, 11(1): 41—47
- 李 莉,宋林生,2006. 皱纹盘鲍遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋水产研究, 27(1): 59—63
- 李太武,杨文新,宋林生等,2003. 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai ino*)和杂色鲍(*Haliotis diversicolor Reeve*)遗传多样性的 RAPD 分析. 海洋与湖沼, 34(4): 443—449
- 李明云,张海琪,朱俊杰等,2004. 罗氏沼虾浙江养殖群体与缅甸自然群体遗传差异的 RAPD 分析. 水产学报, 4(1): 156—161
- 李家乐,钱荣华,鲍宝龙等,2005. 中国五大湖三角帆蚌遗传多样性的 RAPD 分析. 上海水产大学学报, 14(1): 1—5
- 杨品红,杨利娟,李梦军等,2007. 洞庭青鲫和彭泽鲫 DNA 提取及其 RAPD 分析. 湖南文理学院学报(自然科学版), 19(1): 59—61
- 杨品红,杨武东,王晓艳,2008. 洞庭湖区三角帆蚌染色体及核型研究. 湖南文理学院学报(自然科学版), 20(1): 64—68
- 杨慧荣,江世贵,2006. 用 RAPD 技术探讨 5 种鲴科鱼类的亲缘关系. 水产学报, 30(4): 469—474

- 汪桂玲, 袁一鸣, 李家乐, 2007. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析. 水产学报, 31(2): 152—158
- 宋林生, 李俊强, 李红蕾等, 2002. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与养殖种群的遗传结构及其遗传分化的研究. 高技术通讯, 7(2): 83—86
- 张四明, 邓 怀, 晏 勇等, 2000. 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 31(1): 1—7
- 张全启, 徐晓斐, 齐 洁等, 2004. 牙鲆野生群体和养殖群体的遗传多样性比较. 中国海洋大学学报, 34(5): 816—820
- 林从容, 贾 平, 谢求成, 1998. Shannon 采样定理的由来和一些数学方面的发展. 遥测遥控, 3(2): 103—106
- 周 莉, 樊连春, 桂建芳, 1998. 银鲫复合种外源遗传物质整合的 RAPD 分析. 水生生物学报, 22(4): 301—306
- 周泽杨, 夏庆友, 1998. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性关系. 遗传, 20(5): 12—15
- 钱名全, 2004. 三角帆蚌. 湖南农业, 8: 16
- 颜金鹏, 刘少军, 孙远东等, 2005. 异源四倍体鲫鲤雌核发育后代的 RAPD 分析. 水生生物学报, 29(3): 259—265
- Bassam B J, Caetano, Anolles G *et al*, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem, 196(1): 80—83
- Lynch M, 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol Bid Evo, 7: 478—484
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 19: 538—590
- Nei M, Marayuma T, Chkraborty R, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 29: 1—10
- Sambrook E, Fritsch T, Maniatis T *et al*, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 306—310
- Tajima F, 1983. Evolutionary relationship of DNA sequence in finite populations. Genetics, 105: 437—445
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596—1599
- Wei Kaijian, Xiong Bangxi, Wang Zhi *et al*, 2006. Genetic diversity of five freshwater mussels in genus *Anodonta* (Mollusca: Bivalvia) revealed by RAPD analysis. Acta Hydrobiologica Sinica, 30(6): 684—691
- Welsh J, Peterson C, Mc Clelland M, 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucl Acids Res, 20: 303—306
- Williams J G, Kubelik A R, Lival K J, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res, 18: 6531—6535
- Yeh E C, Boyle T J B, 1991. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belgian Botany, 129—157

GENOMIC DNA EXTRACTION AND RAPD ANALYSIS ON *HYRIOPSIS CUMINGII* DISTINGUISHED BY PEARL-BREED

YANG Pin-Hong^{1,2,3}, WANG Zhi-Tao¹

(1. College of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde, 415000; 2. Hunan Province Marine Products Engineering Technique Research Center, Changde, 415000; 3. Dahu Aquaculture Co., Ltd., Changde, 415000)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to assess the genetic diversity of two populations of *Hyriopsis cumingii* distinguished by pearl-breed, six individuals from each population were randomly selected, followed by genomic DNA extraction using the SDS-phenol-chloroform method and KIT method. Of 80 10-nucleotide-long random primers used in the preliminary analysis, 12 primers produced well-amplified and reproducible band patterns. They were screened and used for further analysis. The amplified products were electrophoretically analyzed through horizontal agarose gel and vertical polyacrylamide gel methods. The results show that the number of loci detected, percentage of polymorphic fragments, Shannon's index of phenotype diversity, Nei's index of genediversity, average genetic distance and similarity estimated by Lynch's index are 100, 33%, 0.1927, 0.1324, 0.904, 0.096 in pearl-breed population, and 94, 47.87%, 0.2711, 0.1879, 0.861, 0.139 in non-pearl-breed population, respectively. The average inter-population genetic distance between this two populations is 0.821, showing that the gene variability in pearl-breed population is greater than that in non-pearl-breed one. Specific bands and variable bands were observed between this two groups, and these bands may be the effective genes associated with pearl-growth. The molecular phylogenetic trees constructed by UPGMA and NJ methods with MEGA4.0 clearly reveal that the all pearl-breed population are clustered into one group, while those of non-pearl-breed, another group.

Key words *Hyriopsis cumingii*, Artificial pearl-breeding, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Genetic diversity