

我国五大淡水湖三角帆蚌群体 mtDNA CO_{II} 基因片段变异分析

李家乐 王建军 汪桂玲 白志毅

(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)

SEQUENCE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT (CO_{II}) GENE OF *HYRIOPSIS CUMINGII* FROM THE FIVE FRESHWATER LAKES OF CHINA

LI Jia-Le, WANG Jian-Jun, WANG Gui-Ling and BAI Zhi-Yi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture,
Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

关键词:三角帆蚌;线粒体 DNA;CO_{II} 基因;遗传多样性;亲缘关系

Key words: *Hyriopsis cumingii*; Mitochondrial DNA; CO_{II} gene; Genetic diversity; Phylogenetic Relationship

中图分类号:Q781;Q344 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2008)05-0779-04

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*), 隶属于瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 真瓣鳃目 (Eulamellibranchia), 蚌科 (Unionidae), 帆蚌属 (*Hyriopsis*)。三角帆蚌是中国特有的优质淡水育珠母蚌。随着珍珠养殖产业的发展, 生产中三角帆蚌种质退化严重, 筛选或培育出品质优良的三角帆蚌是当前亟需解决的关键问题之一。我国五大湖鄱阳湖、洞庭湖、太湖、巢湖和洪泽湖是三角帆蚌的主要分布区域, 对五大淡水湖三角帆蚌群体遗传多样性、群体间遗传变异及亲缘关系的研究将对三角帆蚌种质资源保护和良种选育产生重要的意义。

mtDNA CO_{II} 基因由于具有独特的遗传特性, 被用来分析生物遗传多样性和亲缘关系^[1]。运用 mtDNA CO_{II} 基因对贝类进行遗传进化方面的研究国外已经有较多报道, 例如对淡水贝类幼虫寄生策略的进化研究^[2]、淡水贝类遗传多样性和亲缘关系研究^[3]、牡蛎两个种亲缘关系研究^[4]、黑鲍种内群体间的研究^[5]。但国内利用 mtDNA CO_{II} 基因对淡水贝类遗传多样性和亲缘关系基本上没有研究, 对三角帆蚌的研究尚未见报道。本研究通过测定线粒体 DNA 细胞色素 c 氧化酶 (CO_{II}) 基因片段序列, 分析中国五大淡水湖三角帆蚌线粒体基因序列的多态性, 以期为进一步开展三角帆蚌 DNA 多态性分析、种质资源的研究及遗传育种提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 五大湖三角帆蚌鄱阳湖进贤群体 (PJ) 及洞庭湖群体 (DT)、太湖群体 (TH)、洪泽湖群体 (HZ)、巢湖群

体 (CH) 是野生群体繁育的第一代。他们的亲本分别于 2001 年 10 月份到 2002 年 2 月份之间采集^[6], 采集后饲养在浙江诸暨王家井珍珠养殖场, 并采取了严格的隔离措施。每个群体随机取 6—10 个个体, 用无水乙醇固定三角帆蚌的外套膜, 放置 4 冰箱保存。

鄱阳湖另外 5 个野生群体于 2006 年 8 月份分别取自余干大塘湖区 (PG)、珠湖湖区 (PZ)、都昌湖区 (PD)、湖口湖区 (PH)、永修昌邑湖区 (YX), 采集地点均为离湖岸较远的深水处。采集完后每个群体取 5—9 个个体现场取外套膜组织, 无水乙醇固定, 带回实验室后放 4 冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 提取 每个样本取用无水乙醇固定的三角帆蚌的外套膜组织 150mg 左右, 双蒸水冲洗, 酚氯仿提取 DNA, 用核酸蛋白仪检测 DNA OD 值, 确定 DNA 的纯度、浓度。1% 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 质量。-20 保存备用。

1.3 PCR 扩增及序列测定 PCR 扩增所用引物: LCO1490: 5'-GGTCAACAAA TCA TA AAGA TA TTGG-3 和 HCO2198: 5'-TAAACTTCA GGGTGACCAAAAAA TCA-3^[7,8], 引物由上海生工生物公司合成。

PCR 反应体系: 体系为 50μL, 包括: 模板 DNA 50—100ng, 10 × Buffer 5μL, 4 种 dNTP 各 0.2mmol/L, 上、下游引物各 0.2μmol/L, Taq DNA 聚合酶 2U, MgCl₂ 1.5mmol/L。反应条件: 反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 型 PCR 仪上进行。反应条件如下: 94 预变性 3min, 94 变性 45s, 48 退

收稿日期: 2006-11-13; 修订日期: 2007-10-12

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项项目 (06-05-05B); 上海市科委重点基础项目 (03JC14063); 上海高校水产养殖 E 研究院 (03E009); 上海市水产养殖重点学科建设项目 (Y1101) 资助

作者简介: 王建军 (1982—), 男, 江苏人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物种质资源与种菌工程。E-mail: jwwang@smail.shfu.edu.cn

通讯作者: 李家乐, Tel: 021-65710216; E-mail: jlli@shfu.edu.cn

火 1min, 72 延伸 1min, 经 35 个循环后再在 72 延伸 5min。每次反应都设不含模板的空白对照。PCR 产物送往上海生工生物工程有限公司, 纯化后直接进行测序反应, 测序引物为 LCO1490。

1.4 数据处理 用 BLAST 软件将测序结果与 GenBank 中的相关序列进行同源性比较, 用 ClustalW 软件对所测得的序列进行比对, 并经人工核查。利用 DNASP4.0 软件统计单倍型及多态位点 (s), 平均核苷酸差异数 (k) 和核苷酸多样性指数 (Pi)。利用 MEGA3.1 软件进行所测序列的编辑、排序、系统发育和遗传学分析, 采用 Kimura 双参数模型计算遗传距离, 用 NJ 法构建系统树。

2 结果

2.1 mDNA CO 基因序列的 PCR 扩增结果

从提取的基因组 DNA 中 PCR 扩增到 700bp 左右的 mDNA CO 基因序列。扩增结果 (图 1)。

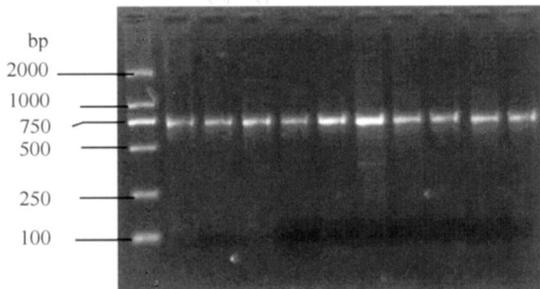


图 1 三角帆蚌 10 群体 mDNA CO 部分序列的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products for mDNA CO of ten *Hyriopsis cumingii* stocks

2.2 mDNA CO 基因序列测定及碱基组成

对中国五大湖三角帆蚌十个群体共 69 个个体的总 DNA 进行扩增, 均得到了特异性很好的 PCR 产物。PCR 产物直接测序得到大约 680bp 的碱基序列, 通过 BLAST 分析比较确认所得片段为 CO 基因片段。经 ClustalW 同源排序, 剪去测序中不准确的序列, 最终得到了 610bp 的核苷酸片段。

用 MEG3.1 软件对五大湖 10 个群体三角帆蚌的碱基 (T, C, A, G) 组成作了计算, 发现其碱基组成差异不大, A + T 的含量都明显高于 G + C 的含量。

2.3 mDNA CO 基因序列变异及其遗传多样性参数

使用 DNASP4.0 软件对中国五大湖三角帆蚌 10 个群体的遗传多样性参数进行计算 (表 1)。从表 1 可以看出, 五大湖各个三角帆蚌群体的核苷酸多态位点数不相同, 鄱阳湖 6 个群体的核苷酸多态位点在 39 到 45 之间, 居五个湖首位。其次是洞庭湖和太湖群体, 分别是 39 个和 24 个, 而洪泽湖群体和巢湖群体的多态核苷酸位点数分别为 5 个和 14 个; 在五个湖三角帆蚌群体中, 鄱阳湖 6 个群体的平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数值分别在 9.233 到 11.750 和 0.03011 \pm 0.02042 到 0.03955 \pm 0.02943 之间, 明显高于其他四个湖三角帆蚌群体, 其次是洞庭湖群体和太湖群体, 洪泽湖群体最低, 其平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数值分别为 2.148 和 0.00226 \pm 0.00254。在 10 个群体中, 鄱阳湖 6 个群体 41 个个体有单倍型 30 种; 太湖 6 个个体和洞庭湖 9 个个体, 分别为 4 种和 5 种; 洪泽湖群体的单倍型最少, 6 个个体只有 1 种单倍型。

表 1 三角帆蚌 10 群体 mDNA CO 遗传多样性参数

Tab. 1 Genetic diversity for mDNA CO of ten *Hyriopsis cumingii* stocks

群体 Stock	个体数 (n)	单倍型数 ($NHap$)	多态位点数 (S)	平均核苷酸差异数 (k)	核苷酸多样性指数 (Pi)
CH	7	2	14	5.210	0.00711 \pm 0.00182
DT	9	5	39	9.543	0.02839 \pm 0.02609
TH	6	4	24	7.251	0.01861 \pm 0.01008
HZ	6	1	5	2.148	0.00226 \pm 0.00254
PJ	10	8	43	10.851	0.03955 \pm 0.02943
PH	6	5	45	11.750	0.03880 \pm 0.02850
YX	5	3	39	9.233	0.03011 \pm 0.02042
PY	5	3	40	9.567	0.03043 \pm 0.02938
PZ	9	7	43	10.661	0.03730 \pm 0.03960
PD	6	4	41	9.741	0.03136 \pm 0.04054

2.4 mDNA CO 基因序列的遗传距离

基于所测得的序列, 利用 MEGA3.1 软件中的 Kumara 双参数模型 (转换加颠换, 转换比颠换) 计算五大湖三角帆蚌 10 个群体间的相对遗传距离 (表 2)。从表 3 中可以看到, 五大湖三角帆蚌 10 个群体间的遗传距离在 0.0021 到 0.0422

之间, 鄱阳湖六个点群体间遗传距离相对较近, 遗传距离在 0.0021 到 0.0073 之间, 余干群体和都昌群体之间的遗传距离最近为 0.0021。五大湖群体间遗传距离相对较远, 遗传距离在 0.0111 到 0.0422 之间, 太湖群体与洪泽湖群体之间的遗传距离最远为 0.0422。

表 2 三角帆蚌 10 群体 mDNA CO 核苷酸序列遗传距离

Tab. 2 Genetic distance for mDNA CO of ten *Hyriopsis cumingii* stocks

	PY	PZ	PD	PH	YX	PJ	CH	DT	TH	HZ
PY										
PZ	0.0041									
PD	0.0021	0.0032								
PH	0.0043	0.0051	0.0030							
YX	0.0032	0.0042	0.0021	0.0043						
PJ	0.0064	0.0073	0.0051	0.0060	0.0061					
CH	0.0120	0.0131	0.0120	0.0131	0.0122	0.0111				
DT	0.0351	0.0352	0.0362	0.0352	0.0360	0.0372	0.0372			
TH	0.0302	0.0301	0.0301	0.0303	0.0301	0.0313	0.0331	0.0413		
HZ	0.0383	0.0383	0.0382	0.0380	0.0382	0.0401	0.0403	0.0381	0.0422	

2.5 基于 mDNA CO 基因序列的分子系统树

用 MEGA3.1 软件中的 NJ 法对所测序的 69 个样本进行系统树的构建,得到 10 个群体之间的系统聚类图(图 2)。从图中可以看出,鄱阳湖 6 个群体聚在一起,并与巢湖群体亲缘关系相近,然后鄱阳湖、巢湖这二个群体再和太湖群体聚在一起。洞庭湖群体和洪泽湖群体亲缘关系相近,单独为一支。

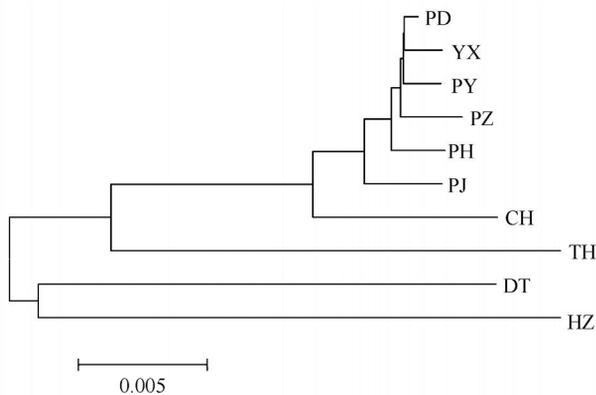


图 2 三角帆蚌 10 群体 mDNA CO 基因的 NJ 系统树

Fig. 2 mDNA CO Neighbor-joining phylogenetic tree of ten *Hyriopsis cumingii* stocks

3 讨论

采集的五大淡水湖三角帆蚌样本是否有代表性是本研究考虑的重要内容之一。为此,笔者采集了鄱阳湖内 6 个点的三角帆蚌群体,并对它们的 CO 基因片段序列分别进行了分析,结果发现鄱阳湖内部各采样点之间碱基组成、核苷酸多态位点数、平均核苷酸差异数、核苷酸多样性指数等指标差异很小,从系统进化上完全聚集在一起,这表明对于三角帆蚌而言,湖泊内部的一个取样点基本可以代表整个湖泊的情况。另外,采集的三角帆蚌野生群体在池塘养殖并繁育一代后,遗传多样性是否有变异也是本研究需考虑的问题。从鄱阳湖 6 个点的结果来看,1 个子一代群体与 5 个野生群

体几乎没有差异,因此繁育一代也能代表野生群体的情况。

基于 mDNA CO 基因水平上的遗传距离表明,鄱阳湖内 6 个群体三角帆蚌间的遗传距离在 0.0021 到 0.0073 之间,Thorp^[9]认为种群间的遗传距离应在 0.030—0.200,可以推断鄱阳湖内的 6 个三角帆蚌群体同属一个种群。三角帆蚌是底栖贝类,活动范围很少,鄱阳湖是我国第一大淡水湖泊,按理说会形成几个种群,但却没有形成,这与三角帆蚌拥有钩介幼虫这一特殊发育阶段有关。从三角帆蚌繁殖习性来看,它是体内受精,受精卵成熟排出体外为钩介幼虫,钩介幼虫主要寄生在鱼鳃和体表部分,变态后从鱼体脱落沉入湖底。目前了解的寄主鱼主要有黄颡鱼和鳊鱼,前者活动范围不广,主要在鄱阳湖区域内活动,后者活动范围较大,可以从湖泊到长江流域。它们把钩介幼虫带到各个水域,与湖泊内甚至湖泊外的三角帆蚌进行基因交流,使得湖内各个点的三角帆蚌群体间的遗传差异很小,各个点的三角帆蚌群体间的遗传多样性基本相同。

从五大湖三角帆蚌群体间的遗传距离看,巢湖与其他 4 个湖泊的遗传距离都在 0.0111 到 0.0131 之间,其他 4 个湖泊之间的遗传距离均超过 0.030,根据 Thorp 种群间的分别方法,鄱阳湖、洞庭湖、太湖和洪泽湖三角帆蚌应该为独立的种群,而巢湖三角帆蚌不是独立的种群。从 NJ 法构建的 mDNA CO 分子系统树及形态学^[10]、SSR^[11]和 RAPD^[12]研究结果均显示,巢湖与鄱阳湖三角帆蚌亲缘关系最近,从地理位置上看,鄱阳湖与巢湖也较近,这表明巢湖的三角帆蚌有可能从鄱阳湖来的。巢湖是一个相对封闭的水体,鄱阳湖的三角帆蚌如何进入巢湖?通过鳊鱼携带钩介幼虫,还是通过人为的移植,还需要进一步证实。

鄱阳湖群体的核苷酸多态位点在 39 到 45 之间,核苷酸多样性指数在 0.03011 ± 0.02042 到 0.03955 ± 0.02943 之间,显著高于其他湖泊三角帆蚌群体,洪泽湖群体和巢湖群体的多态核苷酸位点数和核苷酸多样性指数最低,遗传多样性较低。初步判断五大湖遗传多样性由高到低的顺序为:鄱阳湖、洞庭湖、太湖、巢湖、洪泽湖。过去利用 RAPD 和 SSR

技术,对我国五大湖三角帆蚌的遗传多样性进行了分析,结果也认为鄱阳湖群体三角帆蚌遗传多样性最高,洞庭湖群体和太湖群体其次,洪泽湖群体最低^[11,12],本研究结果和过去的研究结果相同。对五大湖三角帆蚌群体和诸暨养殖群体生长性能比较研究显示,鄱阳湖三角帆蚌群体生长性能和成活率最高^[13],育珠性能也较好,结合本次研究鄱阳湖群体三角帆蚌遗传多样性丰富的结果,因此可以将鄱阳湖群体三角帆蚌在生产上直接加以利用,同时还可以将鄱阳湖群体三角帆蚌用做选择育种的基础群体,进一步进行良种选育。

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,除鄱阳湖群体三角帆蚌外,洞庭湖和太湖群体三角帆蚌也拥有较高的遗传多样性,而较高的遗传多样性是良种选育的基础。因此建议加强对鄱阳湖、洞庭湖和太湖的三角帆蚌种质资源的保护,以维持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] Simon C, Frati F, Beckenbach A, *et al*. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 1994, **87**: 651—701
- [2] Zanatta D T, Murphy R W. Evolution of active host-attraction strategies in the freshwater mussel tribe Lampsilini (Bivalvia: Unionidae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **41**: 195—208
- [3] Mock K E, Brim-box J C, Miller M P, *et al*. Genetic diversity and divergence among freshwater mussel (*Anodonta*) populations in the Bonneville Basin of Utah [J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**: 1085—1098
- [4] Boudry P, Heurtebise S, Lapegue S. Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed *Cnassostrea gigas* and *Cnassostrea angulata* specimens: a new oyster species in Hong Kong [J]? *Aquaculture*, 2003, **228**: 15—25
- [5] Guenther KM, Burton R S. Genetic diversity and species identification in the endangered white abalone (*Haliotis sorenseni*) [J]. *Conservation Genetics*, 2005, **6**: 929—939.
- [6] Qian R H. Comparative study on Morphology, Growth and Molecular Genetics of *Hyriopsis cumingii* Populations in China's Five Large Lakes [D]. Thesis for Master of Science. Shanghai Fisheries University, Shanghai 2003 [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. 硕士学位论文, 上海. 2003]
- [7] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al*. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**: 294—299
- [8] King T L, Eackles M S, Gjetvaj B, *et al*. Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity [J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**: 65—78
- [9] Thorp J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics [J]. *Annual Review of Ecology Systematics*, 1982, **13**(1): 139—168
- [10] Qian R H, Li J L, Dong Z G, *et al*. Morphological variations analysis among populations of *Hyriopsis cumingii* in five large lakes of China [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, **34**(4): 112—119 [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. 海洋与湖沼, 2003, **34**(4): 112—119]
- [11] Wang G L, Li J L. SSR analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship among five populations of *Hyriopsis cumingii* from the five lakes of China [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(2): 152—158 [汪桂玲, 李家乐. 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, 2007, **31**(2): 152—158]
- [12] Li J L, Qian R H, Bao B L, *et al*. RAPD analysis on genetic diversity among the stocks of *Hyriopsis cumingii* from the five large lakes of China [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, **14**(1): 1—5 [李家乐, 钱荣华, 鲍宝龙, 等. 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, 2005, **14**(1): 1—5]
- [13] Li J L, Bai Z Y, Qian R H. Comparative Study on Growth Performance among the Stocks of *Hyriopsis cumingii* from the Five Large Lakes of China and One Cultured Stock of *Hyriopsis cumingii* from Zhuji City [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2006, **33**(6): 243—246 [李家乐, 白志毅, 钱荣华. 中国五大湖三角帆蚌群体和诸暨养殖群体生长性能比较研究. 水产科技情报, 2006, **33**(6): 243—246]