

文章编号: 1674-5566(2011)02-0161-06

中华鳖黄河群体选育世代 F_1 、 F_2 及 F_3 遗传变异微卫星分析

张志允¹, 李思发¹, 蔡完其¹, 谢中富^{2,3}, 殷黎明^{2,3}

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306; 2. 绍兴国家级中华鳖原种场, 浙江 绍兴 312035; 3. 绍兴中亚工贸园有限公司, 浙江 绍兴 312035)

摘要:以中华鳖黄河群体的选育基础群体(F_0)和太湖群体为对照群体,采用微卫星标记技术对黄河群体的选育世代 F_1 、 F_2 及 F_3 的遗传变异进行了测定和分析。结果表明:(1)从所筛选的 10 个微卫星位点中,5 个测试群体共检测出 240 个等位基因;平均等位基因数(N_e)为 4.60~5.30,平均有效等位基因数(N_e)为 3.24~3.59,平均观察杂合度(H_o)为 0.483 3~0.530 0,平均期望杂合度(H_e)为 0.594 9~0.645 9,平均多态信息含量(C_{PI})为 0.534 0~0.568 4,这些遗传参数表明中华鳖存在丰富的可供选育用的遗传多样性基础。(2) F_1 、 F_2 及 F_3 选育世代的遗传多样性参数 H_o 、 H_e 及 C_{PI} 一致地显示出随着选育代数的增加而降低的明显趋势,证明以生长、体色、体型等表型指标为直观选育指标的群体选育,对遗传型指标产生了可检测到的影响。(3)黄河群体的选育基础群体和 3 个选育世代在聚类分析中聚为一支,而太湖群体单独为一支,显示中华鳖的黄河、太湖两大地理群体间存在较大遗传分化,3 代选育并未改变这一历史性格局。

研究亮点:首次应用微卫星技术对中华鳖黄河群体的 F_1 、 F_2 、 F_3 3 个选育世代及其选育奠基群体的遗传变异进行分析,发现 3 个选育世代的遗传多样性有随着选育世代的递增而递减的明显趋势,揭示了人工选育可使选育群体趋于纯化的规律;同时,整体而言 4 个群体在大多数位点遗传多样性均较高,表明遗传选育存在较大潜力。

关键词: 中华鳖; 黄河; 选育; 微卫星; 遗传变异

中图分类号: S 917

文献标识码: A

中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 属爬行纲 (Reptilia)、龟鳖目 (Testudinata)、鳖科 (Trionychidae)、鳖属 (*Trionyx*)。在我国除西藏、青海及新疆外的各个地区均有分布,以长江流域和华南地区为多见^[1];国外主要分布于邻国朝鲜、日本和越南^[2]。中华鳖虽没有有效的亚种分化,却存在着许多地理群体,例如,分布于黄河中下游的黄河群体、太湖周边地区的太湖群体等。它们在体型、体色及生长速度等方面均存在差异。太湖群体(以下简称太湖鳖)是国家级绍兴中华鳖原种场的保种对象。

李思发等^[3-4]认为,同中华鳖的其他地理群体相比,中华鳖黄河群体(以下简称黄河鳖)表现出较佳的经济性状和遗传性状。绍兴中华鳖原

种场于 2000 年引进了黄河鳖,并开展了群体选育,迄今已产生了 F_1 、 F_2 及 F_3 世代。本实验是在以前工作^[3-5]的基础上,以黄河鳖选育基础群体 (F_0)和太湖鳖群体为对照,采用微卫星标记技术对黄河鳖选育世代 F_1 、 F_2 及 F_3 的遗传多样性进行研究,以了解选育过程中的遗传变异,为黄河鳖的进一步选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用黄河鳖基础群体 (F_0)、选育世代 F_1 、 F_2 及 F_3 群体及太湖鳖群体均来自绍兴中华鳖原种场。每个群体分别选取个体重量为 5 g 左右的受精卵,孵化后在同一栋暗式温室内分池饲

收稿日期: 2010-06-04 修回日期: 2010-10-23

基金项目: 浙江省绍兴市重点农业科研项目(2009A22027)

作者简介: 张志允(1985-),男,硕士研究生,专业方向为种质资源与种苗工程。E-mail: zhiyun2008beijing@163.com

通讯作者: 李思发, E-mail: sfl@shou.edu.cn

养,温度保持在 $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。3个月后,随机地从每个群体中取健康鳖30只,个体体重范围为50~100 g,各取1 g左右后肢肌肉组织, $-20 ^\circ\text{C}$ 保存备用^[5]。

1.2 基因组 DNA 提取

取0.1 g左右鳖腿部肌肉,加入400 μL STE缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl)。混匀后加入浓度分别为1%的SDS和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白酶K,55 $^\circ\text{C}$ 左右作用过夜。加入等体积饱和酚于自制转轮上缓慢转动1 h,10 000 r/min离心10 min,吸取上清液加入等体积的混合液(酚:氯仿:异戊醇=24:24:1),缓慢转动0.5 h,弃下层液后,加入等体积的异丙醇或2倍体积的无水乙醇沉淀DNA,再用70%的乙醇洗涤、干燥,加入500 μL 的TE

溶解备用。用752型紫外分光光度计检测样品的浓度与纯度。

1.3 微卫星引物筛选及PCR扩增

从已报道的微卫星引物^[6]中,选取15对引物,另依据美国国立生物技术信息中心网上提交的序列设计10对引物,共25对引物。均由上海生物工程技术服务有限公司合成。在25对引物中筛选出特异性强、重复性好的10对微卫星引物,其序列见表1。

反应体系为3 μL buffer,0.1 mmol/L 每种dNTP,引物浓度为0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$,约50~100 ng基因组DNA,1单位Taq酶,反应总体积为25 μL ,加入30 μL 石蜡油。在Eppendorf Mastercycler Gradient PCR仪上进行扩增。

表1 用于扩增的10对微卫星引物
Tab.1 10 pairs of microsatellite primers

位点	引物序列(5'-3')	重复单元	片段大小(bp)	退火温度($^\circ\text{C}$)	登录号
P-01	F: AGGCCAGAAGGGACCATTTA R: TGGTCGATCATTTCGCTGTG	(GT)18	215~246	60	DQ371907
P-04	F: CATGGTCTAGGCAGTGCTGA R: GAGAGAACAGCCTCGCTGA	(CA)9	121~125	60	DQ371911
P-05	F: GCCACGTACTCGTGGTTCAT R: GGAGGCTGTTTCACGACTG	(TG)9	108~110	58	DQ371915
P-06	F: GCACCAGGAAAGAGTCAAGAA R: CAGCCCGAGAAGATCAGAAT	(AC)8	123~125	58	DQ371916
P-09	F: CAACCCAATCTGCAGACAC R: GAATTGCATGGAAGGCAGAT	(AC)16	153~169	62	DQ371922
P-10	F: AAAGCAGGGGAGAGAACAGC R: CATGGTCTAGGCAGTGCTGA	(GT)9	132~134	62	DQ371923
P-11	F: GCACCAGGAAAGAGTCAAGAA R: CAGCCCGAGAAGATCAGAAT	(AC)8	123~125	58	DQ371924
P-12	F: ACGCAGGACCAAGAGTGAGG R: TGTGCCACTCCCGTATTGT	(CA)10	145~151	58	DQ371917
PS-04	F: AGTGAACCTTGCACATGCCAG R: TCCAGTGAAGGTTCCAGACA	(GT)10	161~185	62	DQ371914
PS-11	F: ACCAGTCAGGAAAGTTGACAC R: GCCAGTTACCAAGAGATGGA	(AC)5(AG)11	183~228	62	FJ889059

注: F是正向引物; R是反向引物。

1.4 PCR产物的电泳检测

PCR产物采用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶,1 \times TBE缓冲液,10 V/cm低电压电泳。分子量标准为pBR322DNA/MspI。电泳结束后,取下凝胶用双蒸水漂洗5 min,后转移至250 mL 0.1%硝酸银染色10 min,再用双蒸去离子水快速漂洗2次后,加入500 mL 2%氢氧化钠显色(临用配制,含0.2 g碳酸钠,2 mL 37%甲醛),待条带充分显

现后,加入双蒸水终止显色。

用数码相机进行拍照、记录。并用Gene Tools软件对每对微卫星引物扩增的等位基因的分子量大小进行估算。

1.5 数据统计与分析

利用Popgen 32进行统计分析,计算微卫星位点的观测等位基因数、有效等位基因数、基因观测杂合度、基因期望杂合度、遗传距离和遗传

相似系数等遗传参数。

多态信息含量 (polymorphism information content, C_{PI}) 按 BOTSTEIN 等^[7]的公式计算。

$$C_{PI} = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \right) \quad (1)$$

式中: p_i 、 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因的频率; n 为等位基因数目。

用 Mega 4 软件根据群体间遗传距离,采用非加权配对算术平均法 (unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA)^[8] 构建 5 个群体的系统树,以分析群体间的亲缘关系。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

本实验所选用的 10 对微卫星引物,在中华

鳖的 5 个群体中均能扩增出清晰的条带,且全部具有多态性。图 1 所示分别为引物 P-09 和 PS-11 在 5 个群体中的部分扩增图谱。10 个微卫星位点在 5 个群体中共检测到 240 个等位基因,其中,在黄河鳖选育世代 F_1 、 F_2 以及太湖鳖群体中均检测到 48 个等位基因,在黄河鳖基础群体 F_0 及选育世代 F_3 中分别检测到 43 和 53 个等位基因。10 个微卫星位点中,PS-11 检测到的等位基因最多(16 个),P-10 和 P-11 最少(2 个)(表 2)。黄河鳖 F_1 的等位基因数为 2~11 个,平均为 4.8 个;黄河鳖 F_2 为 2~12 个,平均为 4.8 个;黄河鳖 F_3 为 2~15 个,平均为 5.3 个;黄河鳖 F_0 为 2~10 个,平均为 4.3 个;太湖鳖群体为 2~13 个,平均为 4.8 个(表 3)。

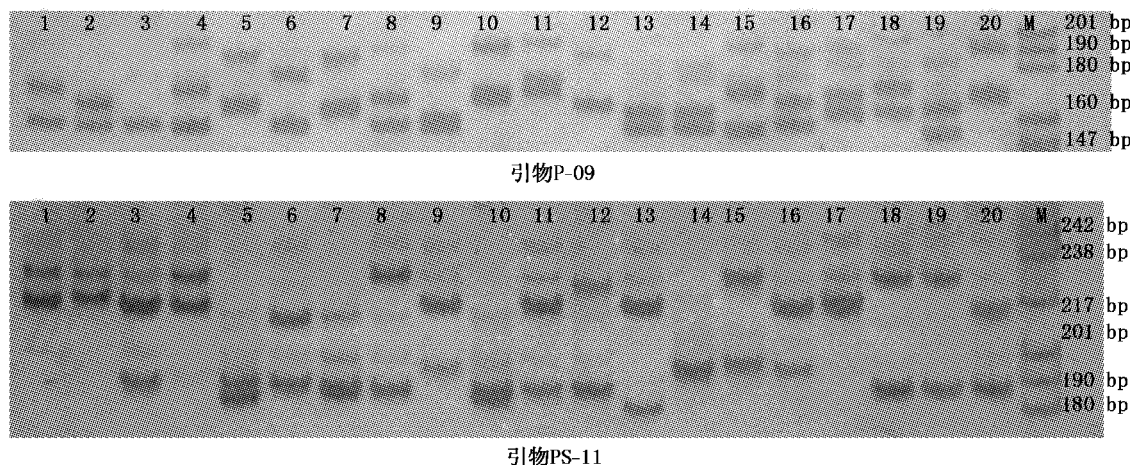


图 1 黄河鳖选育群体微卫星聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 PAGE pattern of microsatellite DNA in populations of F_{1-3} selected generations of Yellow River population of *Trionyx sinensis*

1~4. 黄河鳖 F_1 ; 5~8. 黄河鳖 F_2 ; 9~12. 黄河鳖 F_3 ; 13~16. 太湖鳖; 17~20. 黄河鳖 F_0 ; M. PBR322DNA/*MspI*.

表 2 10 个微卫星位点在 5 个中华鳖群体的实测遗传多态性参数

Tab. 2 Observed parameters of 10 microsatellite loci in studied 5 populations of *Trionyx sinensis*

微卫星位点	平均有效等位基因 N_e	平均等位基因数 N_a	平均观测杂合度 H_o	平均期望杂合度 H_e	平均多态信息含量 C_{PI}
P-01	4.37	6	0.586 7	0.773 5	0.710 0
P-04	1.91	4	0.366 7	0.478 8	0.393 2
P-05	2.53	4	0.526 7	0.606 1	0.492 9
P-06	1.70	3	0.280 0	0.414 1	0.326 0
P-09	8.77	11	0.720 0	0.888 9	0.858 4
P-10	1.82	2	0.300 0	0.452 4	0.345 3
P-11	1.90	2	0.466 7	0.462 3	0.349 2
P-12	3.34	4	0.520 0	0.702 9	0.624 9
PS-04	2.60	4	0.500 0	0.617 5	0.554 6
PS-11	8.03	16	0.786 7	0.878 5	0.839 5
平均值 ± 标准差	3.70 ± 2.62	5.60 ± 4.46	0.505 4 ± 0.165 4	0.627 5 ± 0.177 8	0.549 4 ± 0.202 9

表3 黄河鳖选育群体及其他群体的遗传多样性

Tab.3 Genetic diversity in selected generations of Yellow River and other populations of *Trionyx sinensis*

	平均有效等位基因 N_e	平均等位基因数 N_a	平均观测杂合度 H_o	平均期望杂合度 H_e	平均多态信息含量 C_{PI}
黄河鳖 F_0	3.32	4.6	0.530 0	0.621 1	0.548 3
黄河鳖 F_1	3.34	4.8	0.500 0	0.628 8	0.555 0
黄河鳖 F_2	3.56	4.8	0.486 7	0.609 2	0.541 1
黄河鳖 F_3	3.36	5.3	0.483 3	0.594 9	0.534 0
太湖鳖	3.59	4.8	0.5267	0.645 9	0.568 4

2.2 群体内的遗传多样性

表2列出了10个微卫星位点在5个中华鳖群体的实测遗传多态性参数。整体而言,中华鳖在大多数位点遗传多样性均较高,如平均观测杂合度(H_o)总平均值为0.505 4;但标准差较大(0.165 4),在P-01($H_o = 0.586 7$)、P-05($H_o = 0.526 7$)、P-09($H_o = 0.720 0$)、P-12($H_o = 0.520 0$)、PS-11($H_o = 0.786 7$)5个位点遗传多样性较高;而在P-04($H_o = 0.366 7$)、P-06($H_o = 0.280 0$)及P-10($H_o = 0.300 0$)3个位点遗传多样性略低;又如平均多态信息含量,总平均值为0.549 4,标准差为0.202 9,在P-01、P-09、P-12、PS-04、PS-11等5个位点都表现为高度多态($C_{PI} > 0.5$),而在P-04、P-05、P-06、P-10、P-11等位点则呈低度多态($C_{PI} < 0.5$),具有较高的遗传多样性。这些情况表明中华鳖的遗传选育存在较大潜力。

由表3可知,5个群体的平均观察杂合度(H_o)

范围为0.483 3~0.530 0,平均期望杂合度(H_e)范围为0.594 9~0.645 9,平均多态信息含量范围为0.534 0~0.568 4,表明5个中华鳖群体均具有较为丰富的遗传多样性;在3个选育群体中, F_1 、 F_2 及 F_3 的 H_o 依次为0.500 0、0.486 7、0.483 3, H_e 依次为0.628 8、0.609 2、0.594 9, C_{PI} 依次为0.555 0、0.541 1、0.534 0,表明3个选育群体的遗传多样性随着选育世代的递增而递减。

2.3 群体间遗传差异及亲缘关系

遗传相似性系数和遗传距离是衡量群体亲缘关系的重要的指标。根据Popgene 3.2依据NEI^[9]计算群体间的遗传距离和遗传相似性系数如表4所示,在3个选育群体中, F_1 与 F_3 之间遗传距离最大(0.063 6),遗传相似系数最小(0.938 3),说明两者亲缘关系较远; F_2 与 F_3 遗传距离最小(0.037 3),遗传相似系数最大(0.963 4),说明两者亲缘关系较近。

表4 黄河鳖选育群体间的遗传距离与遗传相似系数

Tab.4 Nei's genetic distance and genetic similarity of selected generations of Yellow River and other populations of *Trionyx sinensis*

	黄河鳖 F_1	黄河鳖 F_2	黄河鳖 F_3	太湖鳖	黄河鳖 F_0
黄河鳖 F_1		0.962 1	0.938 3	0.948 4	0.966 5
黄河鳖 F_2	0.038 6		0.963 4	0.933 4	0.956 7
黄河鳖 F_3	0.063 6	0.037 3		0.924 8	0.958 6
太湖鳖	0.053 0	0.069 0	0.078 2		0.947 3
黄河鳖 F_0	0.034 1	0.044 2	0.042 2	0.054 1	

注:对角线以下为遗传距离;对角线以上为遗传相似性系数。

用Mega 4软件根据群体间遗传距离,用Upgma法得出5个群体间的系统进化树(图2),5个群体聚成了两支,黄河鳖群体聚为一支,而太湖鳖则单独为一支,进一步证明这两大地理群体间存在较大遗传分化。

3 讨论

3.1 中华鳖群体遗传变异分析

关于龟鳖遗传变异,已有一些报道。如刘至

治等^[5]对黄河鳖、淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖及太湖鳖5个群体进行RAPD分析表明,中华鳖的遗传多样性较丰富。李思发等^[4]应用聚合酶链式反应(PCR)技术和限制性长度多态(RFLP)方法,对我国华东地区中华鳖3个地方群体的线粒体DNA的分析发现,南京群体与绍兴群体的遗传距离最近,青岛群体与绍兴群体的遗传距离最远。马丽莎等^[10]利用22个ISSR引物对来自广东从化和福建寿宁的野生平胸龟的遗传多样性

的研究表明,分布于这两个地区的平胸龟总居群和居群内均具有较高的遗传多样性,且广东从化居群遗传多样性高于福建寿宁居群。朱新平等^[11]运用 RAPD 技术对乌龟的遗传多样性进行分析,结果表明乌龟的遗传多样性水平较高。本研究利用微卫星技术对黄河鳖选育奠基群体、3 个选育世代群体及太湖群体的遗传变异进行分析,发现整体而言中华鳖在大多数位点遗传多样性较高,其遗传选育存在较大潜力。

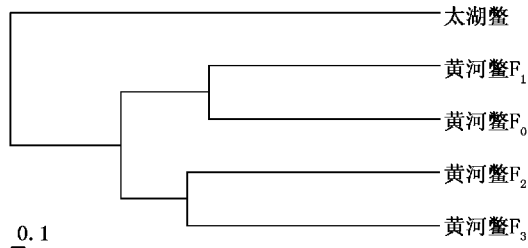


图2 基于 Nei's 遗传距离构建的黄河鳖选育群体等 UPGMA 树

Fig. 2 The dendrogram of selected generations of Yellow River and other populations of *Trionyx sinensis* based on standard genetic distance using UPGMA method

3.2 黄河鳖选育群体的亲缘关系

遗传相似系数是衡量群体间遗传变异程度的可靠参数,群体间亲缘关系越近,则遗传变异性越低,相似系数值越大^[12]。根据微卫星分析结果建立的系统进化树显示,在黄河鳖的各选育世代之间, F_1 与 F_3 亲缘关系较远, F_2 与 F_3 亲缘关系较近, F_1 与 F_2 亲缘关系要近于 F_1 与 F_3 之间的亲缘关系,远于 F_2 与 F_3 之间的亲缘关系。这一结果符合我们选育的预期,即随着人工选育世代的累进,世代间的遗传变异将逐代显现。另外,黄河鳖各群体与太湖鳖群体之间的遗传距离均较大,而遗传相似系数较小,说明黄河鳖各群体之间的亲缘关系要近于与太湖鳖之间的亲缘关系,3 代选育并不改变生物进化与区域分化的历史性格局。

3.3 选育对群体遗传多样性的影响

黄河鳖 F_1 、 F_2 、 F_3 3 个选育世代的平均多态信息含量、平均观测杂合度及平均期望杂合度都逐代走低,即选育世代的遗传多样性有随着选育世代的递增而递减的明显趋势。我们在中华鳖的

选育中,首先将直观的经济性状,如生长速度、体型、体色等作为重要的选育指标,相关基因难以做为直观指标,但选育的实际效果是,选育既导致了养殖性能的改良,例如,绍兴中华鳖原种场提供的资料显示,黄河鳖选育群体的生长速度比基础群体 (F_0) 提高了 10% ~ 20%;裙边指数(后侧裙边宽/背甲全长)比基础群体 (F_0) 提高了 10% 左右,也导致了遗传参数值的逐代递减,即群体遗传多样性的降低。这和罗非鱼选育的类似报道^[13]一起,佐证了人工选育可使选育群体趋于纯化的规律。

参考文献:

- [1] 王培潮. 中国的龟鳖[M]. 上海:华东师范大学出版社, 2000:50-56.
- [2] 杨渡远,唐大由,刘顺元,等. 中国龟鳖类原色图谱[M]. 广州:广东经济出版社,1997:48.
- [3] 蔡完其,李思发,刘至治. 中华鳖七群体稚鳖-成鳖阶段养殖性能评估[J]. 水产学报,2002,26(5):433-439.
- [4] 李思发,吕国庆,李晨虹,等. 华东地区中华鳖三个地方群体的 mtDNA 多态分析[J]. 中国水产科学,1997,4(3):1-6.
- [5] 刘至治,蔡完其,李思发. 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 水产学报,2004,28(2):119-126.
- [6] QUE Y F, ZHU B, ROSENTHAL H. Isolation and characterization of microsatellites in Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(6): 1265-1267.
- [7] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [8] NEI M, MAMYAMA T, CHAKRABORTY R. The bottleneck effect and genetic variability in Populations [J]. Evolution, 1975, 29(1): 1-10.
- [9] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [10] 马丽莎,郑光明,朱新平,等. 濒危平胸龟两个自然居群的 ISSR 分析[J]. 动物学杂志, 2007, 42(6): 13-20.
- [11] 朱新平,杜合军,周莉,等. 乌龟遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 167-171.
- [12] PLOSKY Y, CAHNER A, HABERFED A. DNA Fingerprint bands applied to linkage analysis with quantitative trait loci in chickens [J]. Animal Genetics, 1993, 24(2): 105-110.
- [13] 李先仁,李思发. 尼罗罗非鱼 8 个养殖群体遗传差异的微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(1): 1-7.

Microsatellite analysis of genetic variation in F_1 , F_2 and F_3 selected generations of Yellow River populations of Chinese soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*

ZHANG Zhi-yun¹, LI Si-fa¹, CAI Wan-qi¹, XIE Zhong-fu^{2,3}, YIN Li-ming^{2,3}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shaoxing National Chinese Soft-shelled Turtle Wild Strain Farm, Shaoxing 312035, China; 3. Shaoxing Zhongya Industry and Trade Zone Co., Ltd., Shaoxing 312035, China)

Abstract: To assess genetic variations during genetic selection of Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*), the specimens of Chinese soft-shelled turtle, collected from three selected generations (F_1 , F_2 and F_3) of Yellow River population as testing group, and their base population (F_0) as well as the Taihu population as control group, were amplified by ten pairs of microsatellite primers. The result showed that: (1) A total of 240 alleles were detected in all examined loci. In all five populations the value of average allele number (N_a) were 4.60 – 5.30, the value of average of effective number of alleles (N_e) were 3.24 – 3.59; the value of average observed heterozygosity (H_o) were 0.483 3 – 0.530 0, the value of average expected heterozygosity (H_e) were 0.594 9 – 0.645 9 and the value of average polymorphism information content (C_{PI}) were 0.534 0 – 0.568 4. (2) The three selected generation's heredity multiple parameter H_o , H_e and C_{PI} demonstrated decreased identically, along with the increases of selected generations. It indicated that the mass selection targeted on phenotypes such as growth, body color, body shape, produced a detectable effect on the genotype. (3) The phylogenetic tree showed that studied five populations were clustered into two groups, the first group consisted of the four Yellow River populations while the second group belongs to Taihu Lake population. It indicated that a significant genetic differentiation between Yellow River populations and Taihu Lake population existed and has not been changed by current three generations selection.

Key words: Chinese soft-shelled turtle; Yellow River; selection; microsatellite; genetic variation