

华东地区中华鳖地方群体 mtDNA 多态分析

李思发 吕国庆 李晨虹

(农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海水产大学, 200090)

马东标 林志定 胡国祥

(浙江绍兴东埔中华鳖集团公司, 312069)

摘要 应用多聚酶链式反应(PCR)技术和限制性长度多态(RELP)方法, 对我国华东地区中华鳖三个地方群体的线粒体 DNA(mtDNA)的细胞色素(cyt)b 基因进行了分析。6种限制性内切酶共获得18种酶谱和14种基因型。cytb 基因大小的估算值为 $1080 \pm 60\text{bp}$ 。基因型多样性和核苷酸序列多样性指数分别为 0.6879 ± 0.0978 和 0.0266 ± 0.0978 。浙江绍兴、江苏南京和山东青岛中华鳖群体间存在显著的遗传差异($P < 0.05$), 其中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。三群体的遗传关系与地理距离相一致, 暗示地理分隔可能是造成中华鳖群体遗传分化的主要原因。还发现内切酶 *He* III 和 *Hha* I 可作为中华鳖种群鉴定的标志酶。

关键词 中华鳖, mtDNA, 多态分析

近十多年来, 我国中华鳖(*Trionyx sinensis*)养殖高速发展, 对提高人们的生活水平、出口创汇起到了积极的作用。由于鳖市场高利可图, 养鳖场大量收集亲鳖, 鳖资源遭到了前所未有的酷捕。中华鳖天然资源正遭受着毁灭性的破坏。而在养鳖场, 鳖的近亲繁殖现象十分普遍, 造成养殖群体优良性状衰退。另外, 异种鳖大量引进我国, 部分已逃入天然水体, 严重威胁我中华鳖种质资源。为保护中华鳖种质资源, 为实现中华鳖良种生产和管理的标准化提供基础资料, 本文报告了华东地区中华鳖 mtDNA 多态分析的结果。目前对中华鳖种群 mtDNA 多态研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 样本采集

野生中华鳖样本采自浙江绍兴(26只) 江苏南京(28只)和山东青岛(6只)。样本鳖体重在250g左右。取肝脏1-3g, 95%的酒精保存。

1.2 总DNA的抽提

按 Bernatchez 等^[2]描述的方法进行。

收稿日期: 1996-09-04。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增中华鳖 mtDNA 细胞色素(cyt) b 基因。扩增所用的引物为 V-GluI 和 V-Tpro2^[7]。反应体积设计为 50 μ l, 其中模板 DNA 1 μ l, 两种引物各 2 μ l (16 pmol), 50 μ M 的 dNTP 4 μ l, 缓冲液(10 $\times$) 5 μ l, Taq 聚合酶(2.5U) 0.5 μ l 及双蒸水 36.5 μ l。PCR 扩增反应在 PE-480 温度循环仪(美国 Cetus 公司)上通过由 3 个文件构成的程序来实现。File 1 设计为预变性: 95 $^{\circ}$ C, 2 分钟, 1 个循环; File 2 为扩增: 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 秒, 退火 45 $^{\circ}$ C, 30 秒, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒, 35 个循环; File 3 为充分延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 分钟, 1 个循环。

1.4 内切酶消化

利用 6 种限制性内切酶(DdeI、Hae III、Hha I、Hinf I、Rsa I、Taq I)消化 mtDNA cytb 基因片段, 1% 琼脂糖电泳观察结果。消化所用的 DNA 量据 PCR 检测结果而定, 一般为 5 μ l 左右。内切酶和缓冲液用量参考厂家(Gibco BRL, Pharmacia, Promega)的说明书。

1.5 结果检测

酶切片段在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, 溴化乙锭染色, λ -DNA(经 Hind III 消化及 Hind III/EcoR I 双重消化)作为分子量标准, 紫外灯下拍照记录。依据标准片段的迁移率及已知的分子量绘出标准曲线, 再依据各酶切片段的相对迁移率计算出大小。

1.6 数据处理和分析

用字母如 A、B、C 命名内切酶的酶谱。由所有内切酶的酶谱构成样本的基因型。依据同一酶谱中酶切片段的数目和大小来确定酶切位点, 分别用数字 1 和 0 来表示酶切位点的存在和缺少^[3]。

利用所采用的内切酶数目及获得的基因型资料建立基因型文件; 利用内切酶酶切位点和识别序列资料建立内切酶文件。应用 REAP^[5]软件中的 GENERATE、D、DA 程序处理上述两文件, 可估算基因型间的核苷酸序列歧化距离、基因型多样性及核苷酸序列多样性^[7]。

应用 REAP 软件中的 MONTE 程序进行 1 000 个随机变换的卡方检验, 以检测 mtDNA 基因型在地理分布上是否存在差异^[8]。

聚类分析图依据 Sneath 和 Sokal^[9]的 UPGMA 方法构建。

2 结 果

2.1 中华鳖 mtDNA cytb 基因的内切酶谱和分子大小

用 6 种内切酶消化中华鳖 mtDNA 的(cyt) b 基因, 共获得 18 种酶谱, 其中 Rsa I 和 Taq I 仅具有 1 种酶谱(表 1)。基因片段的大小是 $1\,080 \pm 60$ bp。

2.2 MtDNA 基因型及多样性指数

从华东地区中华鳖的三个群体中发现 mtDNA 基因型共 14 种(见表 2)。基因型多样性指数为 0.6879 ± 0.0978 , 核苷酸序列多样性指数为 0.0266 ± 0.0978 。

2.3 中华鳖 mtDNA 群体遗传差异

华东地区中华鳖 mtDNA 基因型的分布如表 3, 其中浙江绍兴、江苏南京和山东青岛中华鳖群体分别有 5 种、9 种和 3 种基因型。

不同地方群体中华鳖的遗传距离(核苷酸序列的歧化距离)如表 4, 相应的 UPGMA 聚类分析图如图 1。表 4 和图 1 的结果表明南京鳖同绍兴鳖遗传距离较小, 关系最近, 绍兴鳖与青岛鳖遗传距离最大, 关系最远。

表 1 中华鳖 mtDNA cytb 基因用 6 种内切酶消化的结果

Table 1 Results of mtDNA cytb gene of soft-shelled turtles digested with 6 endonucleases

酶及其 片段大小 Endonuclease and Fragment size (bp)	酶谱 Partten	酶及其 片段大小 Endonuclease and Fragment size (bp)	酶谱 Partten	酶及其 片段大小 Endonuclease and Fragment size (bp)	酶谱 Partten	酶及其 片段大小 Endonuclease and Fragment size (bp)	酶谱 Partten	酶及其 片段大小 Endonuclease and Fragment size (bp)	酶谱 Partten	酶及其 片段大小 Endonuclease and Fragment size (bp)	酶谱 Partten
Dde I	A B C D E	Hae III	A B C D E	Hha I	A B C D	Hinf I	A B	Rsa I	A	Taq I	A
480	· · · ·	470	·	1040	·	610	· ·	305	·	725	·
320	· · · ·	315	·	500	· · · ·	265	· ·	305	·	225	·
270	· · · ·	280	· ·	310	· · · ·	200	·	265	·	185	·
215	· · · ·	260	·	230	·	100 *	·	210	·		
180	·	190	· ·	185	·	100 *	·				
170	· · · ·	170	· · · · ·	115	·						
160 *	· · ·	170	·	115 *	·						
135 *	·	145	· · · ·	45 *	·						
90 *	· ·	110	·								
50 *	·	105	· · · · ·								
		105	· · · · ·								
合计		20 *	·								
1185		1000		1040		1075		1085	1135		

* 估算值

表 2 华东地区中华鳖 mtDNA cytb 基因的基因型及相应的酶谱

Table 2 Haplotypes and patterns of mtDNA cytb gene of soft-shelled turtles from East China

基因型 Haplotypes	酶 及 酶 谱 Endonuclease and partten						基因型 Haplotypes	酶 及 酶 谱 Endonuclease and partten					
	Dde I	Hae III	Hha I	Hinf I	Rsa I	Taq I		Dde I	Hae III	Hha I	Hinf I	Rsa I	Yaq I
TS1	A	A	A	A	A	A	TS8	C	D	C	A	A	A
TS2	A	B	A	A	A	A	TS9	C	A	C	A	A	A
TS3	B	A	A	A	A	A	TS10	A	A	B	B	A	A
TS4	C	A	A	B	A	A	TS11	A	E	D	B	A	A
TS5	D	A	A	A	A	A	TS12	E	E	D	B	A	A
TS6	C	A	B	B	A	A	TS13	C	E	D	B	A	A
TS7	A	A	A	B	A	A	TS14	A	C	A	A	A	A

表 3 MtDNA 基因型浙江绍兴、江苏南京和山东青岛中华鳖群体间的分布

Table 3 Distribution of mtDNA haplotypes among populations of soft-shelled turtles from Shaoxing, Nanjing and Qingdao

种群 Population	基 因 型 Haplotypes													
	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	TS9	TS10	TS11	TS12	TS13	TS14
绍兴 Shaoxing	18	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
南京 Nanjing	9	0	1	0	1	4	5	1	2	4	1	0	0	0
青岛 Qingdao	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3	0

表 4 浙江绍兴、江苏南京和山东青岛中华鳖群体遗传距离
Table 4 Genetic distances between each two populations of soft-shelled turtles from Shaoxin, Nanjing and Qingdao

种群 Population	绍兴 Shaoxing	南京 Nanjing	青岛 Qingdao
绍兴	0.00000		
南京	0.00231	0.00000	
青岛	0.03003	0.02399	0.00000

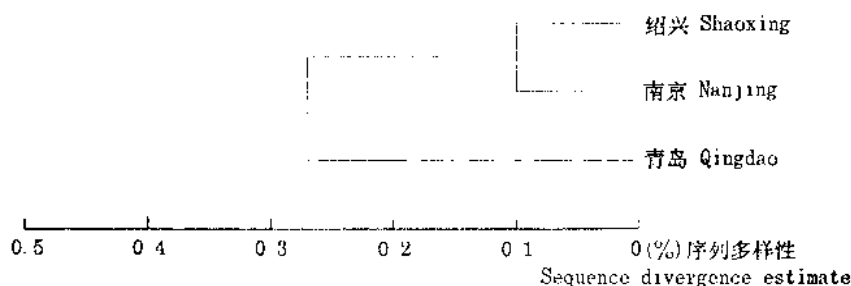


图 1 华东地区中华鳖三个地方群体 mtDNA 的 UPGMA 聚类分析图
Fig.1 UPGMA phenograms clustering mtDNA of three populations of soft-shelled turtle from East China

3 讨论

3.1 华东地区中华鳖群体遗传多样性与遗传差异

中华鳖基因型多样性指数在绍兴、南京和青岛群体分别为 0.4985 ± 0.1039 、 0.8319 ± 0.4478 和 0.7333 ± 0.1552 。而绍兴、南京和青岛三地的样本数分别为 26、28 和 6 尾。从绝对数上看,南京群体的遗传多样性较高,但从相对数来看,青岛群体的遗传多样性较高。绍兴群体遗传多样性无论从绝对值还是从相对数上看都最低,也就是说,绍兴中华鳖遗传变异最小,这是否说明了绍兴中华鳖群体种质较纯,尚需进一步研究。

中华鳖地方群体的遗传距离数值和相应的 UPGMA 聚类分析表明(表 4, 图 1),南京群体同绍兴群体的遗传距离较小,关系最近;绍兴群体与青岛群体遗传距离最大,关系最远。而从地理分布看,南京—绍兴距离最近,绍兴—青岛最远。中华鳖地方群体遗传关系的远近同其地理距离远近相一致,反映了地理因素可能是影响中华鳖的遗传变异性的主要原因。

3.2 中华鳖 mtDNA 多态与遗传标志

MtDNA 因其具有分子较小、结构简单、快速进化和母系遗传等优点,因而 mtDNA 分析在研究动物种间和种内关系的研究中应用十分广泛^[1,4]。在鱼类的种群遗传标志上,mtDNA 方法已取得十分诱人的成果。例如 Wirgin 等^[10,11]用 4 碱基识别序列的内切酶所切的片段谱型作为固定遗传标志来区分美国 Chesapeake 湾和 Roanoke 河的条纹石鲈。本文对中华鳖不同群体 mtDNA 的多态分析,发现 HaeIII 和 HhaI 能显著地将青岛群体同南京群体及绍兴群区分开来(图 2),故初步认为该酶可以作为中华鳖种群鉴定的标志酶。

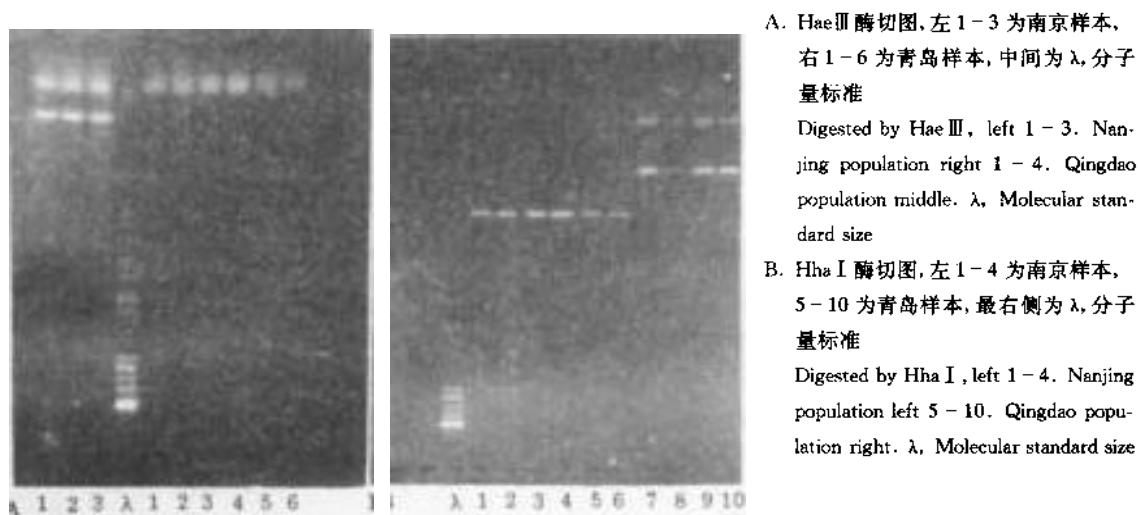


图 2 华东地区中华鳖群体 mtDNA cytb 基因的 Hae III 和 Hha I 酶切图谱

Fig. 2 Enzyme patterns of mtDNA cytb gene in different populations of soft-shelled turtle from East China, digested by Hae III and Hha I

参 考 文 献

- [1] 张亚平等, 1992. 动物线粒体 DNA 多态研究概况. 动物学研究, 13(2): 280-298.
- [2] Bernatchez, L., R. Guyomard, and F. Bonhomme. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. Mol. Ecol., 1: 161-173.
- [3] Bernatchez, L. and J. Dodson. 1991. Phylogenetic relationships among the subfamily Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. Can. J. Fish. Aqua. Sci., 47: 533-543.
- [4] Billington, N. and P.D.N. Hebert. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. Can. J. Fish. Aqua. Sci., 48: (suppl. 1) 80-94.
- [5] McElroy, D., P.E. Moran, E. Bermingham, and I. Kornfield. 1992. REAP: An integrated environment for thmanipulation and phylogenetic analysis of restriction data. J. Hered., 83: 157-158.
- [6] Nei, M. and L. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proc. Nat. Acad. Sci., 76: 5269-5273.
- [7] Park, K.L., M. A. Brainard, D. A. Dightman, and G. A. Winans. 1993. Low levels of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Onchorhynchus keta*). Mol. Mar. Biol. Biotech., 2(6): 262-370.
- [8] Roff, D. A. and P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphism: X2 and the problem of small samples. Mol. Biol. Evol., 6: 535-549.
- [9] Sneath, P. H. A. and R. P. Sokal. 1973. In: Kennedy D., and R. B. Park [eds.]: Numerical Taxonomy. San Francisco., 114-305.
- [10] Wirgin, I. I., P. Silverstein, and J. Grossfield. 1990. Restriction endonuclease analysis of striped bass mitochondrial DNA: the Atlantic coastal migratory stock. Amer. Fish. Soc. Symp., 7: 475-491.
- [11] Wirgin, I. I., L. Maceda. 1992. Development and use of striped bass-specific probes. J. Fish Biol., 39(suppl. A): 159-167.

MTDNA POLYMORPHISM ANALYSIS OF LOCAL POPULATIONS OF SOFT-SHELLED TURTLE FROM EAST CHINA

Li Sifa Lu Guoqing Li Chenhong

(Key Laboratory of Physiology and Ecology in Aquaculture, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, 200090)

Ma Dongbiao Lin Zhiding Hu Guoxiang

(Dongpu Soft-shelled Turtles Group Company, Shaoxing, 312069)

ABSTRACT Technique of polymerase chain reaction (PCR) and method of restriction fragment length polymorphism (RELP) were performed to analyse Cytochrome (cyt) b gene of mtDNA in three populations of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) from East China. 18 patterns and 14 haplotypes were observed with the digestion of 6 endonucleases. The size of (cyt)b gene was 1080 ± 60 bp. Their haplotype diversity and nucleotide diversity indices were about 0.6879 ± 0.0978 and 0.0266 ± 0.0978 . There were obvious genetic differences among the populations from Shaoxing in Zhejiang Province, Nanjing in Jiangsu Province and Qingdao in Shandong Province ($P < 0.05$). The genetic relation was the nearest between populations of Shaoxing and Nanjing, and the farthest between populations of Shaoxing and Qingdao. The genetic distances among the three populations corresponding with their geological distances suggest that the genetic segregations may be the major reason leading to their genetic divergences. It was also discovered that Hae III and Hha I be used as genetic marker for identifying populations of soft-shelled turtles.

KEYWORDS *Trionyx sinensis*, mtDNA, polymorphism

《海洋渔业》1988 年征订启事

《海洋渔业》是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的中级水产科技期刊。主要刊登海洋渔业管理、资源开发与利用、繁殖保护、捕捞技术、鱼虾贝藻类增殖、海洋环境保护、水产品加工利用、保鲜技术、渔业机械仪器等各类文章。

《海洋渔业》为季刊, 16 开 48 页, 逢季中月出版, 国内外公开发行, 每期刊定价 3.50 元, 全年共 14.00 元, 由编辑部自行发行。欢迎广大读者订阅。编辑部地址: 200090, 上海市军工路 300 号; 联系人: 邱卫华; 电话: (021) 65434690 × 95。