

中华鳖两个地理种群遗传多样性的 ISSR 分析

梁红蕾^{1,3}, 鲍传和^{1,3*}, 蒋业林^{2,3}, 李翔^{3,4}, 陈华良^{3,4}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽省农业科学院水产研究所, 合肥 230031;

3. 安徽省鳖类良种繁育与健康养殖工程技术研究中心, 蚌埠 233700; 4. 安徽省喜佳农业发展有限公司, 蚌埠 233700)

摘要: 利用 ISSR 分子标记技术对中华鳖 2 个不同地理种群(淮河群体、台湾群体)的群体遗传多样性进行分析研究。从 32 个 ISSR 引物中筛选出 8 个引物对 2 个中华鳖群体 37 个个体进行扩增, 获得 77 个重复性好且谱带清晰的扩增位点, 其中多态性位点 47 个, 多态位点百分率为 61.04%; 2 个群体的多态位点比例分别为 59.57% 和 51.06%。Nei 基因多样性分别为 0.165 7 和 0.152 4, Shannon 信息指数分别为 0.216 4 和 0.197 7。淮河群体的遗传多样性略高于台湾群体, 群体间遗传距离为 0.083 7。UPGMA 聚类分析显示 37 个个体聚成两个类群。分析结果表明 2 个中华鳖群体的遗传多样性相对贫乏, 2 个养殖群体经过较多世代的人工选育与繁殖可能形成了趋于稳定的独立遗传结构。

关键词: 中华鳖; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S966.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0031-05

Genetic diversities of two geographical populations of *Pelodiscus sinensis* by ISSR

LIANG Hong-lei^{1,3}, BAO Chuan-he^{1,3}, JIANG Ye-lin^{2,3}, LI Xiang^{3,4}, CHEN Hua-liang^{3,4}

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031;

3. Engineering Technology Research Center of Turtle Breeding and Healthful Aquaculture of Anhui Province, Bengbu 233700;

4. Anhui Xijia Agricultural Development Co. Ltd, Bengbu 233700)

Abstract: To assess the genetic diversity of the *Pelodiscus sinensis*, inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular marker was applied from two *Pelodiscus sinensis* populations (Huai River population and Taiwan population). Eight ISSR primers were selected from 32 ones. A total of 77 reproducible DNA fragments were amplified from all the 37 individuals, in which 47 fragments were polymorphic, and the percentage of polymorphic loci was 61.04%. The percentages of polymorphic loci of two populations were 59.57% and 51.06%; the Nei's gene diversities were 0.165 7 and 0.152 4; the Shannon's information indices were 0.216 4 and 0.197 7, respectively. The Huai River population had higher genetic diversity than that of Taiwan population. The average genetic distance was 0.083 7 among 37 individuals. UPGMA analysis showed that 37 individuals were divided into two clusters corresponding to two populations. The results indicated that the two populations have lower genetic diversity, and the cultured populations might form their own stable genetic structures through multi-generation and artificial breeding.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; ISSR; genetic diversity

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*), 俗称甲鱼, 隶属于爬行纲(*Reptilia*)、龟鳖目(*Testudoformes*)、鳖科(*Trionychidae*)。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主, 它

没有有效的亚种分化, 但却存在地理变异^[1-3]。中华鳖因其独特的食用、药用、观赏等价值而深受青睐, 其养殖业也成为农民致富的优势产业, 随着人工养殖规模的不断扩大, 人工养殖的单一生态环境和近

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 安徽省鳖类良种繁育与健康养殖工程技术研究中心资助。

作者简介: 梁红蕾, 女, 硕士研究生。E-mail: lhld348@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 鲍传和, 男, 副教授。E-mail: baohh1202@ahau.edu.cn

亲繁殖导致种质性状退化现象严重,使得我国中华鳖养殖产业的健康发展严重受限。

简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat),简称 ISSR,是 Zietkiewicz 于 1994 由 SSR(simple sequence repeat)的基础上发展而来的一种新的分子标记^[4],该技术直接对基因组 DNA 进行分析,可以特异地扩增出微卫星区域及其相邻区域的 DNA 序列,不受任何环境条件影响,在遗传上多为共显性。与 SSR 相比,ISSR 无需预知靶序列的背景信息,减少了多态性分析的预备工作,并可以在不同物种间通用,不像 SSR 标记具有较强的种属特异性^[5-6]。ISSR 技术操作简单快捷、模板需要量少、多态性丰富、稳定性高,是一种非常理想的检测物种内遗传变异的分子标记,在种群遗传学、种质资源分类学与种系发生学等方面得到了迅速而广泛的应用^[7-11]。作者以 2 个地理种群的中华鳖为研究对象,利用 ISSR 技术开展中华鳖种群遗传结构分析研究,以期获得中华鳖种群遗传变异情况,为中华鳖种群的划分及为优良品种培育提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用不同区域的 2 个中华鳖代表性群体试验材料。试验所用材料于 2010 年 8 月采自安徽蚌埠喜佳农业发展有限公司的良种繁殖基地,其中淮河鳖 19 只,台湾鳖 18 只。现场进行常规生物学测量后,解剖取其腿部肌肉约 0.5 g,置于 1.5 mL 灭菌的离心管中,用无水乙醇固定,保存于 -20°C 冰箱中。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 的提取按照常规蛋白酶 K 消化和酚-氯仿抽提进行^[12]。基因组 DNA 样品提取后用 0.8%琼脂糖凝胶电泳(含 $0.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭)检测其质量,用紫外分光光度计检测其浓度和纯度, DNA 浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) = $50 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times$ 稀释倍数,保存于 4°C 备用。

1.2.2 ISSR 引物初筛 本研究中所用的 ISSR 引物共 32 条,引物序列来自于加拿大哥伦比亚大学设计并公布的 100 条通用引物,由上海生工公司合成,随机选取 1 个中华鳖个体的基因组 DNA 为模板,用 32 种 ISSR 引物进行 PCR 扩增,从中筛选出特异性好的引物。PCR 反应体系的总体积为 $25\ \mu\text{L}$,其中,内含模板 DNA 约 $45\ \text{ng}$, $1 \times \text{PCR Buffer}$ (不含 Mg^{2+}), $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$, $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{dNTPs}$, $0.2\ \text{U}\ \text{Taq 酶}$, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Primer}$ 。PCR 反应程序为

首先 94°C 预变性 $5\ \text{min}$,接着 94°C 变性 $1\ \text{min}$, 54°C 退火 $40\ \text{s}$, 72°C 延伸 $60\ \text{s}$, 38 个循环后, 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ ^[13-15]。

1.2.3 PCR 反应体系的优化 用最初筛选所获电泳条带效果最佳的 1 条 ISSR 引物进行 PCR 体系的优化,PCR 反应程序同上。反应总体积仍为 $25\ \mu\text{L}$,对 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、ISSR 引物、模板 5 个主要成分,设置 5 个不同的浓度梯度,因为各个因素间存在交互作用,故选用 $L_{25}(5^6)$ 正交表设计正交试验,组合 PCR 扩增体系各水平,以第 1 次筛选引物的条件为基础,以获得优化的反应体系。

1.2.4 PCR 扩增及其产物检测 用优化后的反应体系,将筛选出的引物分别对中华鳖的 2 个群体进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色检测,凝胶成像拍照。

1.2.5 数据分析 同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物,电泳图谱中按凝胶同一位置上扩增条带的有无进行统计,有带的计为“1”,无带的计为“0”。生成 0/1 矩数据阵图。利用 POPGENE 软件(1.32)计算多态位点百分率、Nei 的基因多样性、Shannon's 信息指数、遗传距离和遗传多样性^[16-19]等,利用 MEGA4.0 软件构建 UPGMA 系统树。

2 结果与分析

2.1 引物初筛及 ISSR-PCR 反应

正交试验结果如图 1 所示,在 25 个处理组合中,由于 5 种因素不同浓度组合不同,其扩增结果差异明显。泳道 6、9、12、14~17 没有条带,泳道 11、13、23 条带较弱,几乎扩不出条带。泳道 5、7、19 条带清晰,多态性高。通过比较,以条带多态性高、主带清晰、副带明显为原则,同时考虑成本因素,确定 ISSR 的最佳反应体系为组合 19, $25\ \mu\text{L}$ 反应体系中含有 ISSR 引物 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、模板 $30\ \text{ng}$ 、 Mg^{2+} $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTP $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Taq 酶 $0.2\ \text{U}$ 。

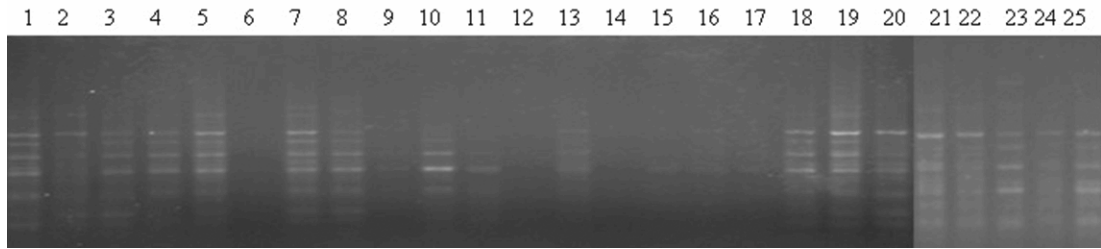
在供筛选的 32 个引物中,有 8 个引物扩增结果稳定、多态性高、信号强、背景清晰。共扩增出 77 个可统计的条带,其中多态性条带 47 条,多态性比例 61.04%。每个引物扩增的条带数为 6~13 条(表 1)。电泳图片显示中华鳖 2 个群体扩增片段大小在 200~3 000 bp 之间(图 2)

2.2 群体多样性分析

2 个中华鳖群体的多态位点比例、Nei 的基因多样性、Shannon 信息指数和遗传距离结果见表 2。结果显示,2 个群体中分别扩增出 28 个和 24 个多态

位点, 多态位点比率分别为 59.57% 和 51.06%。经比较, 发现淮河群体的遗传距离, Nei 的基因多样

性和 Shannon 信息指数均高于台湾群体, 可见台湾鳖的遗传多样性水平相对略低。



1-25 代表 25 个正交组合 1-25 represent 25 orthogonal combinations

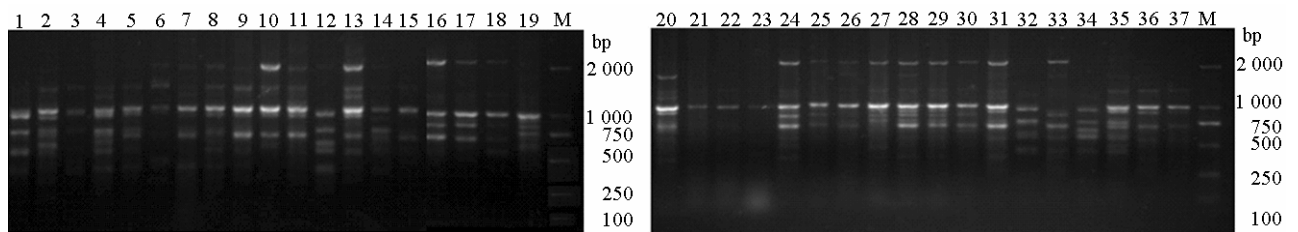
图 1 中华鳖 ISSR-PCR 反应 L₂₅(5⁶) 正交试验电泳结果

Figure 1 The electrophoresis pattern of orthogonal test for ISSR-PCR of *Pelodiscus sinensis*

表 1 筛选引物序列和扩增结果

Table 1 The sequence of primers selected and amplification results

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比例/% Ratio of polymorphic loci
ISSR-11	(GA) ₈ C	13	6	46.15
ISSR-17	(CA) ₈ A	11	6	54.55
ISSR-34	(AG) ₈ YT	14	10	71.43
ISSR-35	(AG) ₈ YC	10	6	60.00
ISSR-36	(AG) ₈ YA	7	5	71.43
ISSR-41	(GA) ₈ YC	9	6	66.67
ISSR-44	(CT) ₈ RC	6	5	83.33
ISSR-54	(TC) ₈ RG	7	3	42.86
Total		77	47	61.04



1-19 为淮河群体; 20-37 号为台湾群体; M 为 Marker 1-19: Huai River population; 20-37: Taiwan population; M: Marker

图 2 引物 ISSR35 对中华鳖 2 个群体的扩增图谱

Figure 2 The amplification patterns of primer ISSR35 in two populations

表 2 中华鳖 2 个种群的遗传多样性比较分析

Table 2 The analysis of the genetic diversities of two populations

项目 Item	淮河鳖 Huai River	台湾鳖 Taiwan	总体水平 Total
多态位点数目 Polymorphic site number	28	24	47
多态位点比例/% Percentage of polymorphic site	59.57	51.06	61.04
观测等位基因 Observed number of alleles	1.735 1	1.722 1	1.723 1
有效等位基因 Effective number of alleles	1.560 3	1.522 2	1.589 5
基因多样性指数 Nei's gene diversity	0.165 7	0.152 4	0.180 4
Shannon 信息指数 Shannon's information index	0.216 4	0.197 7	0.242 1

用 Nei's (1972)法分析得出两个群体之间的遗传相似度和遗传距离(表 3)。两个群体间的遗传分

化系数 G_{st} 为 0.0796, 表明中华鳖总的遗传变异中有 7.96%来自于群体间, 92.04%来自于群体内部。

表 3 中华鳖 2 个群体间遗传相似度和遗传距离
Table 3 Genetic identity and genetic distance among two populations

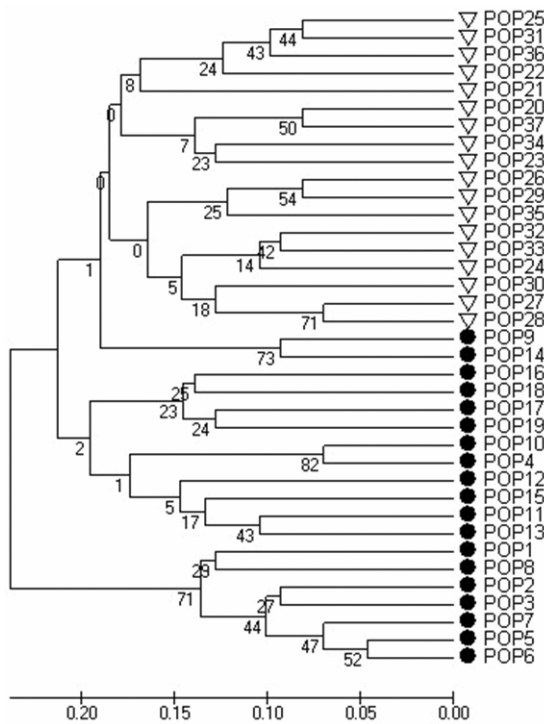
种群 Population	淮河鳖 Huai River population	台湾鳖 Taiwan population
淮河鳖 Huai River population		0.9197
台湾鳖 Taiwan population	0.0837	

注: 对角线上方为遗传相似度; 对角线下方为遗传距离。

Note: Above diagonal: Nei's genetic identity, and below diagonal: genetic distance.

2.3 群体聚类分析

根据中华鳖 2 个种群的 37 个个体扩增结果, 使用 MEGA 4.0 软件构建其遗传分支聚类图。从图 3 可以看出淮河与台湾群体之间出现较明显分支。



POP1-19 为淮河群体; POP 20-37 为台湾群体

POP1-19: Huai River population; POP20-37: Taiwan population

图 3 两个中华鳖群体的 UPGMA 聚类图

Figure 3 UPGMA dendrogram of the two populations of *Pelodiscus sinensis*

3 讨论

3.1 两个中华鳖群体遗传多样性分析及种质保护

遗传多样性指物种所携带信息的总和, 是评价自然生物资源的重要依据。遗传多样性最直接的表现

形式是遗传变异的高低程度。Nei 的基因多样性和多态位点比率是反映群体遗传多样性的重要参数^[20]。本试验首次采用 ISSR 标记对中华鳖 2 个种群的遗传多样性及其遗传结构进行了初步研究。结果表明, 淮河群体和台湾群体的多态性位点比率分别为 59.57%和 51.06%, Nei 的基因多样性分别为 0.1657 和 0.1524, Shannon 信息指数分别为 0.2164 和 0.1977。淮河群体的遗传多样性高于台湾群体。与同样利用 ISSR 技术对江豚^[14]、平胸龟^[18]和赤眼鳟^[19]的研究结果比较, 中华鳖两群体的遗传多样性均处于较低水平, 这与利用 RAPD 技术对其研究结果相一致^[21]。20 世纪 90 年代后, 由于水域污染以及过度捕捞等因素, 中华鳖的天然资源遭受了毁灭性的破坏。而在养殖场, 累代人工繁殖和选育导致近亲繁殖现象十分普遍, 可能是造成其群体遗传多样性处于较低水平的主要原因。为了养鳖业的稳定发展, 应该加大亲本选育量, 并对选育亲本的遗传多样性水平加以适时的检测, 以减少或避免人工选育和繁殖造成的近交和纯合化。

3.2 两个中华鳖群体的遗传分化分析

遗传分化系数是测定群体遗传分化的主要参数。根据 Wright 等^[22]的标准, 群体间存在较低、中等和较高分化时, 遗传分化系数范围分别为 0~0.05, 0.05~0.15 和 0.15~0.25, 本研究的两群体间的遗传分化系数为 0.0796, 表明两群体间存在中等的遗传分化, 并且绝大部分的遗传变异来自于群体内部。群体间的遗传距离揭示了群体遗传分化程度, 反映了种内个体间或种间的亲缘关系的远近^[23], 同一物种不同地理群体遗传距离的变化范围为 0.03~0.2 (遗传相似系数为 0.8~0.97)^[24]。本研究利用 POPGENE 软件计算出 2 个中华鳖群体间的无偏遗传距离, 中华鳖群体间遗传距离为 0.0837 (小于 0.2), 说明 2 个群体遗传分化水平已处于地理群体分化水平; UPGMA 聚类分析结果也明显把中华鳖 37 个个体聚为两个不同的类群, 显示群体间有明显的遗传分化, 表明 2 个群体经过较多世代的人工选育与繁殖可能形成了趋于稳定的独立遗传结构。

参考文献:

- [1] 赵尔宓. 中国龟鳖动物的分类与分布研究[C]//赵尔宓. 中国龟鳖研究. 四川动物, 1997, 15(增刊): 2-14.
- [2] 陈壁辉. 安徽两栖爬行动物志[M]. 合肥: 安徽科学技术出版, 1991: 10-15.
- [3] 赵肯堂. 苏州地区两栖爬行动物多样性及其动态变化[J]. 四川动物, 2000, 19(3): 140-142.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger-

- printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [5] 王长忠, 梁宏伟, 邹桂伟, 等. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1341-1348.
- [6] 樊斌. 微卫星标记及其在猪遗传育种中的应用[J]. *河南农业大学学报*, 1999, 33(2): 160-163.
- [7] Xie J Y, Zhang Z B. Inter-simple sequence repeat and application in the research of genetic diversity [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2004, 24(1): 71-75.
- [8] Xu G P, Zhong X M, Ding Y P, et al. The research on genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* population from the southern part of the Yellow Sea [J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(11): 34-38.
- [9] 杭焱, 金燕, 卢宝荣. 濒危植物华山新麦草的遗传多样性及其保护[J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2004, 43: 260-266.
- [10] Dhanikachalam V, Kangayam M P, Murugiah M, et al. Analysis of genetic relationship in mutant silkworm strains *Bombyx mori* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35: 291-297.
- [11] 乐云辰, 吴亚妮, 张艳玲, 等. 不同薄荷品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. *上海交通大学学报*, 2008, 26(1): 29-32.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatic T. 金东雁, 黎孟枫译. 分子克隆试验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [13] 姜因萍, 何毛贤, 黄良民, 等. 两个大珠母贝群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *热带海洋学报*, 2008, 27(3): 61-65.
- [14] 李东明, 林刚, 郑劲松, 等. 两个不同江豚群体 ISSR 遗传多样性初步分析[J]. *南昌大学学报: 理科版*, 2005, 29(6): 547-550.
- [15] 肖龙骞, 葛学军, 龚洵, 等. 贵州苏铁遗传多样性研究[J]. *云南植物研究*, 2003, 25: 648-652.
- [16] 姜因萍, 何毛贤, 黄良民, 等. 两个大珠母贝群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *热带海洋学报*, 2008, 27(3): 61-65.
- [17] Serapion J, Kucuktas H, Feng J, et al. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish[J]. *Marine Biotechnology*, 2004, 6: 364-377.
- [18] 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.
- [19] 杨太有, 关建义, 陈宏喜. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(4): 530-533.
- [20] Richards C, Lekberg P L. Temporal changes in allele frequencies and population's history of severe bottlenecks[J]. *Conservation Biology*, 1996, 10: 832-839.
- [21] 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): 120-126.
- [22] Wright S. *Evolution and the Genetics of Population Variability Within and Among Natural Population*[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978
- [23] Benzie J A H. Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography [C]// *Biogeography and geological evolution of SE Asia*. The Netherlands Backbuys Publishers, 1998: 197-209.
- [24] Thorp J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation, and systematic [J]. *Annual Review Ecology System*, 1982, 13(1): 139-168.