

文章编号: 1000- 0615(2004)02- 0119- 08

## 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析

刘至治, 蔡完其, 李思发

(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)

**摘要:**从 97 个 10 碱基随机引物中筛选出 30 个多态性引物, 对黄河鳖、淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖及太湖鳖 5 个群体共 100 个个体进行 RAPD 分析。结果表明, 中华鳖的遗传多样性较丰富。表现在: (1) 在获得的 341 条 RAPD 扩增带中, 有 234 条 (68. 6%) 呈现多态性; 2 个引物有可明显地反映种群差异的扩增带, 其中 S105 扩增的 1408bp 在黄河鳖的出现频率仅为 20%, 而在另外 4 个群体的出现频率达 80% ~ 90%; S37 扩增的 438bp 在 5 个群体的出现频率大小为: 黄河鳖 85% > 淮河鳖 65% > 洞庭湖鳖 55% > 鄱阳湖鳖 40% > 太湖鳖 20%, 呈现出从黄河到淮河到长江、从长江的中游到下游逐步降低的遗传渐变现象; (2) 多态位点比例 ( $P$ ) 的大小顺序为: 太湖鳖 59. 25% > 洞庭湖鳖 56. 52% > 鄱阳湖鳖 55. 80% > 淮河鳖 55. 03% > 黄河鳖 54. 43%, 但 5 个群体间的差异不显著 ( $F = 0. 644 < F_{0. 05; 4, 145} = 2. 45$ ); 5 群体内的遗传多态度 ( $\pi$ ) 在 0. 3644~ 0. 3883 间; (3) 群体内遗传相似度大小顺序为: 淮河鳖 0. 782 > 黄河鳖 0. 771 > 鄱阳湖鳖 0. 768 > 洞庭湖鳖 0. 750 > 太湖鳖 0. 722, 其中太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖、鄱阳湖鳖 3 个群体间的差异显著 ( $P < 0. 05$ ); (4) 分子方差分析 (AMOVA) 表明, 黄河鳖与淮河鳖、洞庭湖鳖及鄱阳湖鳖 3 个群体间, 太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖 2 个群体间有极显著的遗传分化 ( $P < 0. 001$ ); (5) 根据遗传距离, 用 UPGMA 和 NJ 法进行聚类分析表明: 黄河鳖与淮河鳖、洞庭湖鳖与鄱阳湖鳖分别先聚在一起, 最后再与太湖鳖聚类, 显示太湖鳖在基因组上与其它 4 个群体鳖存在明显歧化。

**关键词:** 中华鳖; 群体; 遗传变异; 随机扩增多态 DNA

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Analysis of genetic variations of five populations in *Trionyx sinensis* by RAPD

LIU Zhi-zhi, CAI Wan-qi, LI Si-fa

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated

by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** RAPD was conducted to analyse the genetic variations of five populations in *Trionyx sinensis* — Yellow River population, Huai River population, Dongting Lake population, Poyang Lake population and Taihu Lake population, with 30 polymorphic 10-based random primers selected from 97 ones. The major results indicated that the genetic diversity of the five populations in *T. sinensis* was rich. They were: (1) 341 bands were detected and 234 of them were polymorphic, accounted for 68. 6%. Two primers could amplify distinctive bands among the five populations. The appeared frequency of 1408bp band amplified by primer S105 was 20% in the Yellow River

收稿日期: 2003-04-11

资助项目: 上海市水产办《中华鳖养殖业持续发展研究》项目 (科 0095)

作者简介: 刘至治 (1972-), 男, 湖南新宁人, 2001 级博士研究生, 从事水产动物医学研究。Tel: 021- 65710348, E-mail: footballloverlzz@sohu.com

通讯作者: 蔡完其 (1939-), 女, 浙江鄞县人, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物病理与抗逆育种的研究。Tel: 021- 65710333,

E-mail: lsf038@mail.online.sh.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

population, but it was 80%~90% in the other four populations. The range of appeared frequency of 438bp band amplified by primer S37 in the five populations was: Yellow River population 85% > Huai River population 65% > Dongting Lake population 55% > Poyang Lake population 40% > Taihu Lake population 20%, which indicated a genetic decline from Yellow River to Huai River, from middle reaches of Yangtze River to its lower reaches; (2) The range of proportion of polymorphic loci was: Taihu Lake population 59.25% > Dongting Lake population 56.52% > Poyang Lake population 55.80% > Huai River population 55.03% > Yellow River population 54.43%, and there was no significant difference among the five populations ( $F=0.644 < F_{0.05,4,145}=2.45$ ). The genetic diversity index ( $H$ ) was 0.3644~0.3833 in the populations; (3) The average genetic similarity index within each population ranked as Huai River population 0.782 > Yellow River population 0.771 > Poyang Lake population 0.768 > Dongting Lake population 0.750 > Taihu Lake population 0.722. There was significant difference between Taihu Lake population and Yellow River population, Huai River population and Poyang Lake population ( $P < 0.05$ ); (4) The results of analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there was significantly genetic breaking up between Yellow River population and Huai River population, Dongting Lake population, Poyang Lake population respectively, also between Taihu Lake population and Yellow River population, Huai River population respectively ( $P < 0.001$ ); (5) Yellow River and Huai River population, Dongting Lake and Poyang Lake population clustered first respectively, then they clustered with Taihu lake population by UPGMA and NJ method according to their genetic distances, which indicated that there was an obvious divergence between Taihu Lake population and the other four populations.

**Key words:** *Trionyx sinensis*; population; genetic variation; random amplified polymorphic DNA

龟鳖类动物在地球上已生活了约 2.5 亿年<sup>[1]</sup>,但对中华鳖(*Trionyx sinensis*)的种质资源,迄今只有很少的研究<sup>[2-6,18]</sup>。养鳖业的飞速发展,使野生鳖受到空前的酷捕以满足对亲鳖的需求,造成了国内中华鳖的无序流动,以及台湾、泰国鳖的大量输进。在种质资源不甚明了的情况下,我国中华鳖种质正遭受到严重混杂的威胁。

种质是产业的源头。我们从种质入手,对我国代表性的中华鳖各地方种群的形态、养殖性能、遗传特性及免疫力等方面进行了较为系统的研究<sup>[6,20]</sup>。随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一种 DNA 分子标记技术。由于该方法具有安全、快捷、简便、高效等特点,被广泛应用于生物的遗传多样性、群体遗传、分类、亲缘关系等许多研究<sup>[7-12]</sup>。本文报道了应用 RAPD 技术对 5 个代表性中华鳖群体的遗传变异研究的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在长江、淮河、黄河三流域采集代表性群体,产地均经过实地调查选定,为原种的  $F_1$ 。长江流域的从其中、下游的洞庭湖、鄱阳湖、太湖采集

(以下分别简称为洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖、太湖鳖); 黄河流域的从其河口地区采集(以下简称为黄河鳖); 淮河流域的从其中游的蚌埠采集(以下简称为淮河鳖)。黄河鳖来自山东广饶中华鳖养殖场,淮河鳖来自安徽蚌埠省级中华鳖良种场,洞庭湖鳖来自湖南长沙国家级中华鳖原种场,鄱阳湖鳖来自江西鄱阳湖省级中华鳖良种场,太湖鳖来自浙江嘉善中华鳖养殖场。各群体随机取健康鳖 20 只(雌、雄各半),体重为每只 350~550g。取腿部肌肉, -20℃ 保存备用。

10 碱基随机引物共 97 个,购自上海生工生物工程技术服务有限公司。Taq DNA 聚合酶购自加拿大 Biostar 公司。

### 1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 取 0.25g 腿部肌肉,切碎,加入 444  $\mu$ L STE 缓冲液(30mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH8.0, 200mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 50mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl), 混匀后加入 50  $\mu$ L 10% SDS 和 6  $\mu$ L 蛋白酶 K (浓度为 20mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 55~60℃ 烘箱过夜(约 12h)。加入等体积饱和酚于自制的转轮上缓慢转动 1h, 10 000  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10min。吸取上清液加入等体积的混合液(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1), 缓慢转动 0.5h, 取上清液,加入等体积的氯仿-

异戊醇混合液(24:1),缓慢转动5 min。取上清液加入2倍体积的预冷无水乙醇沉淀DNA(-20℃,2h),再用70%乙醇洗涤,干燥,加入500μL的ddH<sub>2</sub>O溶解备用。

PCR扩增 RAPD-PCR扩增条件参照邹曙明等<sup>[11]</sup>的方法并做相应改进。反应在Eppendorf Mastercycler Gradient PCR仪上进行,反应混合物中含3μL buffer(100mmol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl, pH 9.5, 500mmol·L<sup>-1</sup>KCl, 30mmol·L<sup>-1</sup>MgCl<sub>2</sub>, 0.01%明胶,最后调节pH值至9.0)。1μL每种dNTP(浓度2.5mmol·L<sup>-1</sup>), 2μL引物(5μmol·L<sup>-1</sup>), 2μL基因组DNA(约40~200ng), 1.2U Taq DNA聚合酶, 16.4μL纯净水(购自华舜生物工程有限公司),反应总体积为25μL,加入20μL石蜡油。循环程序为:94℃预变性3min,接着94℃45s、36℃45s、72℃90s、45个循环后,72℃延伸10min。

取10μL扩增产物经1.5%进口琼脂糖凝胶(含适量EB)电泳,电泳缓冲液为1×TBE,电压为4.5V·cm<sup>-1</sup>,电泳2.5h后,用Gene-Genius凝胶成像系统拍照、记录和分析。

### 1.3 数据分析

多态位点比例(*P*) 将每条RAPD扩增带看作1个位点,统计每个群体的多态位点比例:

$$P(\%) = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100$$

遗传相似度(*S*)与遗传距离(*D*) 根据Nei等<sup>[13]</sup>的公式计算任意2个体间的遗传相似度(*S*)与遗传距离(*D*):

$$S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$$D = 1 - S$$

其中 $N_{xy}$ 是个体X和个体Y共同拥有的带数, $N_x$ 和 $N_y$ 分别是个体X和个体Y所具有的总带数。

群体内、群体间的平均遗传相似度和遗传距离通过个体间的*S*和*D*值作简单平均求得。

用SPSS10.0(Statistical Package for Social Sciences)统计软件<sup>[14]</sup>中的方差分析(ANOVA)和均值多重比较分析法(LSD法),对各群体的多态位点比例及遗传相似度进行显著性检验。

遗传多态度( $\pi$ )和遗传分化指数( $F_{st}$ ) 经电泳获得RAPD图谱,在同一电泳迁移位置上,有DNA扩增条带的计为1,没有的计为0,每群体所

有个体在全部位点上的谱带式样(RAPD表型)组成1个(0或1)矩阵。用Arlequin 2.0软件进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)<sup>[15]</sup>,计算遗传多态度( $\pi$ )和遗传分化指数( $F_{st}$ )。

聚类分析 根据群体间的遗传距离,用MEGA2软件包<sup>[16]</sup>中的“UPGMA”和“NJ”程序对5个群体进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR扩增结果

本研究从97个随机引物中,筛选出扩增带在3条以上(包括3条)、重复性好、条带清晰的引物30个,其扩增结果如表1。30个引物在5个群体内扩增出341条带(平均每个引物扩增条带数为11.4条),其中107条带(31.4%)在5个群体所有个体间表现稳定的一致性,234条(68.6%)呈现多态性。扩增图谱具有丰富的引物和模板特异性,DNA扩增带大小分布在0.30 kb~3.0 kb之间(图1,图2)。

### 2.2 RAPD分子标记

在用30个多态引物对5个群体中华鳖的100个个体进行PCR扩增的过程中,未发现仅在某一群体出现或不出现的特异RAPD标记带,但引物S105和S37在5个群体中都有可显示种群差异的扩增带。

S105扩增的1408bp在20只黄河鳖中,只有4只出现,出现频率为20%;而在各为20只的淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太湖鳖中,则分别有18、17、17、16只出现此带,出现频率依次为90%、85%、85%和80%。可见,S105扩增的1408bp在黄河鳖群体内出现频率最低,而在另外4个群体的出现频率较高(80%~90%)(图1)。

S37扩增的438bp在黄河鳖、淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太湖鳖5个群体出现频数分别为17、13、11、8和4个个体,频率大小依次为:黄河鳖85% > 淮河鳖65% > 洞庭湖鳖55% > 鄱阳湖鳖40% > 太湖鳖20%。可见,该片段在中华鳖群体间的出现频率呈现出从黄河到淮河到长江、从长江的中游到下游逐步降低的遗传渐变现象(图2,图3)。

表1 筛选出的随机引物及扩增结果

Tab. 1 Selected primers and the results of amplification

引物 primer	序列(5' - 3') sequence	扩增带数 numbers of band	引物 primer	序列(5' - 3') sequence	扩增带数 numbers of band
S4	GGACTGGAGT	3~ 10	S105	AGTCGTCCCC	6~ 13
S5	TGCCGCCCTTC	4~ 10	S112	ACGCGCATGT	6~ 13
S6	TGCTCTGCC	4~ 10	S114	ACCAGTTGG	5~ 12
S10	CTGCTGGAC	3~ 10	S118	GAATCGGCCA	4~ 13
S11	GTAGACCCGT	3~ 10	S119	CTGACCAGCC	6~ 11
S12	CCTGACGCA	5~ 12	S121	ACG GATCCCTG	5~ 12
S22	TGCCGAGCTG	4~ 9	S122	GAGGATCCCT	3~ 9
S36	AGCCAGCGAA	3~ 10	S123	CCTGATCACC	6~ 12
S37	GACCGCTTGT	3~ 9	S124	GGTGATCAGG	5~ 11
S46	ACCTGAACGG	3~ 10	S125	CCG AATTCCC	3~ 10
S47	TTGGACGGG	5~ 9	S126	GGG AATTCCG	6~ 11
S53	GGGTGACGA	3~ 9	S127	CCG ATATCCC	3~ 9
S55	CATCCGTGCT	3~ 10	S128	GGG ATATCCG	3~ 10
S60	ACCCGGTCAC	6~ 14	S134	TGCTGCAGGT	5~ 9
S61	TTCGAGCCAG	3~ 10	S140	GGTCTAGAGG	3~ 9

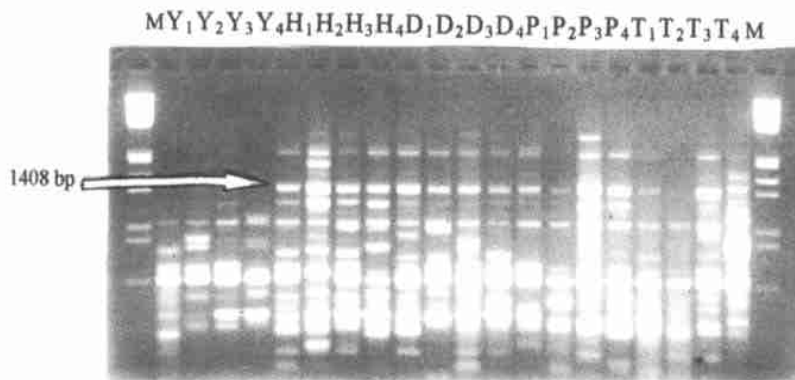


图1 引物 S105 在中华鳖 5 群体中扩增的 1408bp 片段

Fig. 1 The 1408bp band amplified by primer S105 in five populations of *Trionyx sinensis*

Y: 黄河鳖; H: 淮河鳖; D: 洞庭湖鳖; P: 鄱阳湖鳖; T: 太湖鳖; M: λDNA/ *Eco*RI+ *Hind*III

Y: Yellow R.; H: Huai R.; D: Dongting L.; P: Poyang L.; T: Taihu L.; M: λDNA/ *Eco*RI+ *Hind*III



图2 引物 S37 在中华鳖 5 个群体中扩增的 438bp 片段

Fig. 2 The 438bp band amplified by primer S37 in five populations of *Trionyx sinensis*

Y: 黄河鳖; H: 淮河鳖; D: 洞庭湖鳖; P: 鄱阳湖鳖; T: 太湖鳖; M: λDNA/ *Eco*RI+ *Hind*III

Y: Yellow R.; H: Huai R.; D: Dongting L.; P: Poyang L.; T: Taihu L.; M: λDNA/ *Eco*RI+ *Hind*III

### 2.3 DNA 多态性与遗传分化

群体内的 DNA 多态性 5 个群体中华鳖的多态位点比例( $P$ ) 在 50% ~ 60% 间, 其中黄河鳖较低, 为 54.43%, 淮河鳖次之, 为 55.03%, 而长江流域的洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太湖鳖则较高, 分别为 56.52%、55.80% 和 59.25% (表 2)。但方差

分析表明, 5 个群体之间的差异不显著( $F = 0.644 < F_{0.05; 4, 145} = 2.45$ )。

5 个群体内遗传多态度( $\pi$ ) 在 0.3644~ 0.3883 间。太湖鳖较高(0.3883 ± 0.1942), 淮河鳖较低(0.3644 ± 0.1823), 大小顺序为: 太湖鳖 > 洞庭湖鳖 > 鄱阳湖鳖 > 黄河鳖 > 淮河鳖(表 2)。

表 2 5 个群体中华鳖的多态位点比例和遗传多态度  $\pi$  值

Tab. 2 Proportion of polymorphic loci and the genetic diversity index ( $\pi$ ) in five populations of *Trionyx sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
总位点数 total loci	316	318	322	319	319
多态位点数 number of polymorphic loci	172	175	182	178	189
多态位点比例(%) proportion of polymorphic loci	54.43	55.03	56.52	55.80	59.25
遗传多态度( $\pi$ , 平均值 ± 标准误) genetic diversity ( $\pi$ , mean ± SE)	0.3688 ± 0.1845	0.3644 ± 0.1823	0.3745 ± 0.1873	0.3701 ± 0.1852	0.3883 ± 0.1942

遗传分化指数 对中华鳖 5 个群体间的遗传差异进行 AMOVA 分析表明, 在遗传差异的总方差中, 98.65% 的差异来自各群体内部, 仅 1.35% 的差异来自群体间(表 3)。

中华鳖 5 群体间总遗传分化指数为 0.0135。黄河鳖与鄱阳湖鳖的遗传分化指数最高(其  $F_{st} = 0.0305$ ), 太湖鳖与洞庭湖鳖间的遗传分化指数较低( $F_{st} = 0.064$ ); 淮河鳖、洞庭湖鳖与鄱阳湖鳖 3 个群体相互间的遗传分化指数为负值, 表明这 3 个群体中华鳖间的遗传分化不大; 黄河鳖与淮河鳖、洞庭湖鳖及鄱阳湖鳖 3 个群体间, 太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖 2 个群体间有极显著的遗传分化( $P < 0.001$ ) (表 4)。

### 2.4 遗传相似度和遗传距离

群体内的遗传相似度 中华鳖 5 个群体内的遗传相似度大小顺序为: 淮河鳖 0.782 > 黄河鳖 0.771 > 鄱阳湖鳖 0.768 > 洞庭湖鳖 0.750 > 太湖鳖 0.722。方差分析表明, 5 个群体间遗传相似度的差异不显著( $F = 2.346 < F_{0.05; 4, 145} = 2.45$ ), 但经均值多重比较后发现, 太湖鳖与黄河鳖、淮河鳖、鄱阳湖鳖 3 个群体间的差异却显著( $P < 0.05$ )。

群体间的遗传相似度和遗传距离及其聚类分析 中华鳖 5 个群体间的遗传相似度和遗传距离见表 5。遗传相似度总平均值为 0.734。

黄河鳖与淮河鳖间、洞庭湖鳖与鄱阳湖鳖间的遗传距离都是 0.249; 黄河鳖与洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖及太湖鳖这 3 个群体间的遗传距离分别为 0.264、0.276 及 0.285; 太湖鳖与其它 4 个群体间的遗传距离都较大, 在 0.270 以上。

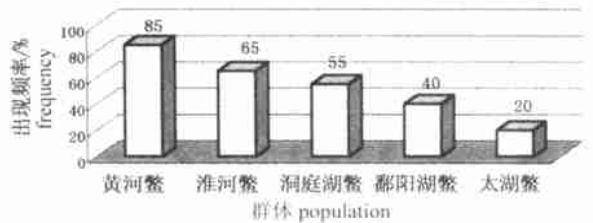


图 3 引物 S37 扩增的 438bp 片段在中华鳖 5 个群体(各 20 个体)中的出现频率

Fig. 3 Distribution frequency of 438bp band amplified by primer S37 in five populations of *Trionyx sinensis* (20 samples each)

根据中华鳖 5 个群体间的遗传距离, 用 MEGA 软件包中的 UPGMA 及 NJ 程序进行聚类分析, 结果一致表明: 5 个群体中华鳖明显分成 3 支, 黄河鳖与淮河鳖聚在一起, 洞庭湖鳖与鄱阳湖鳖另聚在一起, 然后这 2 支再聚在一起, 最后才与太湖鳖聚类(图 4)。这表明黄河流域、淮河流域与长江流域的中华鳖群体间的亲缘关系较远; 而太湖鳖与其它 4 个群体间存在明显的歧化。

表3 中华鳖5群体间遗传差异的分子方差分析表

Tab.3 Analysis of molecular variance in five populations of *Trionyx sinensis*

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例(%)
source of variation	d. f.	sum of squares	variance components	percentage of variance
群体间 among population	4	324.18	0.87	1.35
群体内 within population	95	6045.00	63.63	98.65
总变异 total variation	99	6369.18	64.50	100

表4 中华鳖5群体间的遗传分化指数(F<sub>st</sub>)

Tab.4 Fixation Index (F<sub>st</sub>) among five populations of *Trionyx sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
黄河鳖 Yellow R.	-				
淮河鳖 Huai R.	0.0234 (P < 0.001)	-			
洞庭湖鳖 Dongting L.	0.0270 (P < 0.001)	- 0.0021 (P = 0.571 > 0.805)	-		
鄱阳湖鳖 Poyang L.	0.0305 (P < 0.001)	- 0.0021 (P = 0.571 > 0.05)	- 0.0090 (P = 0.571 > 0.05)	-	
太湖鳖 Taihu L.	0.0231 (P < 0.001)	0.0212 (P < 0.001)	0.0064 (P = 0.143 > 0.05)	0.148 (P = 0.143 > 0.05)	-

表5 中华鳖5个群体间的遗传相似度(对角线右上方)和遗传距离(对角线左下方)

Tab.5 Inter-population genetic similarities(right-upper of diagonal) and distances  
(left-lower of diagonal) in five populations of *Trionyx sinensis*

	黄河鳖 Yellow R.	淮河鳖 Huai R.	洞庭湖鳖 Dongting L.	鄱阳湖鳖 Poyang L.	太湖鳖 Taihu L.
黄河鳖 Yellow R.	-	0.751	0.736	0.725	0.715
淮河鳖 Huai R.	0.249	-	0.748	0.738	0.720
洞庭湖鳖 Dongting L.	0.264	0.252	-	0.752	0.722
鄱阳湖鳖 Poyang L.	0.276	0.262	0.249	-	0.730
太湖鳖 Taihu L.	0.285	0.281	0.278	0.270	-

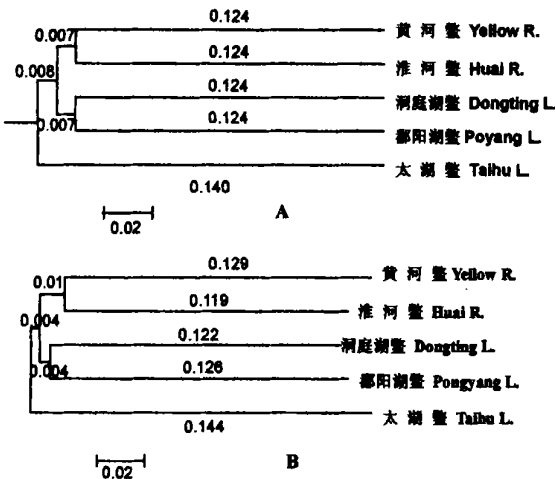


图4 中华鳖5个群体间的聚类关系  
(A: UPMGA 树; B: NJ 树)

Fig. 4 Dendrograms of five populations of *Trionyx sinensis*

by UPGMA and NJ (A: UPMGA tree, B: NJ tree)

### 3 讨论

#### 3.1 不同群体中华鳖的遗传变异

遗传变异是生物体内遗传物质发生变化而造成的一种可以遗传给后代的变异,它表现为不同水平上,即在群体水平、个体水平、组织和细胞水平、以及分子水平上的差异<sup>[17]</sup>。研究物种或群体的遗传变异,尤其是DNA水平的遗传变异,是了解其遗传多样性直接而有效的方法之一。对于在我国自然分布颇广的中华鳖来说,以往对其遗传变异的研究,多集中于形态和生长等方面<sup>[3-6]</sup>;在细胞遗传方面,吴萍等对来自于南京、绍兴、台湾及松江4个地方的中华鳖的核型进行了比较研究<sup>[18]</sup>;在分子遗传方面,仅李思发等对中华鳖绍兴群体、南京群体及青岛群体的线粒体细胞色素b(cyt b)基因进行过RFLP(限制性片段长度多态

性)分析<sup>[2]</sup>。深入地分子水平研究我国代表性中华鳖群体的遗传结构,了解它们的遗传背景及相互关系,可同先前的研究结果相得益彰,有利于为制定科学、合理的保护措施提供理论依据,确保中华鳖优良种质的持续利用和我国养鳖业的健康发展。

用筛选出的、扩增良好的 30 个 10 碱基随机引物对中华鳖 5 群体进行 RAPD 分析的结果表明: 1 在检测到的 341 条带中,仅 107 条在 5 群体稳定出现,它们是进化中较为保守的区域,而呈现多态性的条带达 234 条(68.6%);中华鳖 5 群体内的遗传相似度为 0.722~0.782,群体间遗传相似度为 0.715~0.752,表明其群体内和群体间的遗传变异水平都较高。在鱼类方面,Biecawske 和 Pumo 对大西洋海岸条纹鲈(*Morone saxatilis*)的 5 个群体进行 RAPD 分析表明,群体内、群体间的遗传相似度分别为 0.926~0.956 和 0.870~0.894,他们认为这种鱼群体内的遗传多样性是比较低的<sup>[19]</sup>。比较而言,我们认为中华鳖的遗传多样性水平较高。④群体间的多态位点比例虽差异不显著( $F = 0.644 < F_{0.05; 4, 145} = 2.45$ ),但表现出一定的地理渐变趋势,从黄河鳖(54.43%)、淮河鳖(55.03%)到长江鳖(其中洞庭湖鳖、太湖鳖都在 56.5%以上)递增的趋势。④群体内的遗传多态度( $\pi$ )差异虽不大(表 2),但也是北方的黄河鳖和淮河鳖较小(都小于 0.37),而长江流域的洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖和太湖鳖则较高(都大于 0.37)。可见,我国不同中华鳖群体的遗传多样性都较丰富,而长江流域的中华鳖群体则相对较突出。

比较而言,太湖鳖的遗传相似度(0.722)要显著地小于黄河鳖、淮河鳖及鄱阳湖鳖( $P < 0.05$ ),而多态位点比例(59.25%)和遗传多态度(0.3883 $\pm$ 0.1942)在 5 群体中则都最大,表明太湖鳖的遗传变异最大,这是否是由于太湖地区,尤其是杭州嘉(兴)湖(州)地区是我国养鳖业的最发达地区,引种活动频繁,有可能存在较严重的遗传渐渗问题,有待进一步研究。

### 3.2 中华鳖群体间的遗传分化

UPGMA 和 NJ 法聚类分析表明(图 4),黄河鳖与淮河鳖间、洞庭湖鳖与鄱阳湖鳖间的亲缘关系较近,而太湖鳖与它们的亲缘关系较远。这与形态判别结果相一致<sup>[20]</sup>。

遗传分化指数( $F_{st}$ )是指群体间或个体间的遗

传变异占总的遗传变异的大小。群体间遗传分化指数越大,表明群体间分化越明显,群体间的遗传差异也就越大。由表 4 可知,黄河鳖与淮河鳖、洞庭湖鳖及淮河鳖 3 个群体间,太湖鳖与黄河鳖和淮河鳖这 2 个群体间存在极显著遗传分化( $P < 0.001$ )。不过,对中华鳖 5 个群体的 RAPD 扩增带进行 AMOVA 分析表明,在本研究的 5 个群体、100 个个体的总遗传变异方差中,群体间的遗传变异的方差贡献率仅 1.35%,而群体内遗传变异的方差贡献率却占 98.65%,这表明中华鳖群体间差异不及群体内差异。究其原因可能是:(1)淮河鳖、洞庭湖鳖和鄱阳湖鳖 3 个群体间的遗传分化指数( $F_{st}$ )均为负数(表 4),可能造成 AMOVA 分析中群体间遗传变异方差贡献率过低;(2)20 世纪 90 年代养鳖业的飞速发展,加大了亲鳖的无序流动,可能造成了各地方群体中华鳖的混杂,发生了基因交流,特别是淮河鳖、洞庭湖鳖和鄱阳湖鳖 3 个群体间,由于地理位置相对较近,因人为引种、自然逃逸等原因而造成的基因交流的可能性更大,从而掩盖了各群体之间固有的遗传差异。

### 3.3 中华鳖群体的遗传标志问题

本研究虽未找到各群体中华鳖特异的 RAPD 标记,但引物 S105 扩增的 1408bp 在黄河鳖的出现频率仅为 20%,而在淮河鳖、洞庭湖鳖、鄱阳湖鳖及太湖鳖的出现频率达 80%~90%,说明黄河鳖确实与其它 4 个群体中华鳖存在明显的遗传差异。引物 S37 扩增的 438bp 在中华鳖种群内的出现频率呈现从北到南、从长江的中游到下游逐渐递减的现象,这一遗传渐变的度量可用作区别黄河鳖、淮河鳖与长江流域的中华鳖群体的判据。

由于养鳖业的迅猛发展,对地方种群没有注意保护,群体间的混杂可能已掩盖了种群间部分差异。作者呼吁应予以重视。

在整个试验过程中,本研究室的邹曙明老师和王成辉博士给予许多技术指导和帮助,特此致谢!

## 参考文献:

- [ 1 ] Yang D Y, Tang D Y, Liu S Y, *et al.* Color atlas of testudines of China[M]. Guangzhou: Guangdong Economic Press, 1997. 48. [ 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. ]
- [ 2 ] Li S F, Lu G Q, Li C H. mtDNA polymorphism analysis of local populations soft-shelled turtle from East China[J]. J Fish Sci China, 1997, 4(3): 1- 6. [ 李思发, 吕国庆, 李晨虹. 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. ]
- [ 3 ] Li S F, Li C H, Lu G Q. A primary study on morphological diversity of local populations soft-shelled turtle in East China[J]. J Fish Sci China, 1997, 4(5): 1- 7. [ 李思发, 李晨虹, 吕国庆. 华东地区中华鳖地方群体形态差异初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 1- 7. ]
- [ 4 ] Cai W Q, Li S F, Zhao J L, *et al.* A comparative study on growth performance between populations of Taihu Lake and Taiwan of soft-shelled turtle [J]. Fish Science & Technology Information, 1998, 25(6): 250- 253. [ 蔡完其, 李思发, 赵金良, 等. 中华鳖太湖群体和台湾群体的生长比较研究[J]. 水产科技情报, 1998, 25(6): 250- 253. ]
- [ 5 ] Cai W Q, Gong X W, Sun P F. Comparison on the function of nonspecific immunity between Taihu Lake population and Taiwan population of soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2001, 25(1): 95- 97. [ 蔡完其, 宫兴文, 孙佩芳. 中华鳖太湖群体和台湾群体非特异性免疫功能比较[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 95- 97. ]
- [ 6 ] Cai W Q, Li S F, Liu Z Z, *et al.* Evaluation of aquaculture performance of seven populations of *Trionyx sinensis* from larvae to adult stage [J]. J Fish China, 2002, 26(5): 433- 439. [ 蔡完其, 李思发, 刘至治, 等. 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. ]
- [ 7 ] Gray E M. DNA fingerprints reveals look of genetic variation I. Northern populations of the western pond turtle (*Clemmys marmorata*) [J]. Conservation Biology, 1995, 9(5): 1244- 1255.
- [ 8 ] Patricia G P, Whiteman H H. Genetic diversity in fragmented populations of *Clemmys guttata* and *Chrysemys pictamarginata* as shown by DNA fingerprinting [J]. Copeia, 1993(3): 841- 846.
- [ 9 ] Li S F, Zou S M. Phylogenesis of populations mitten crabs (*Erochër sinensis*, *E. japonicus*) in six river systems of mainland China: RAPD fingerprinting marker [J]. J Fish China, 1999, 23(4): 325- 330. [ 李思发, 邹曙明. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: RAPD 指纹标记[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 325- 330. ]
- [ 10 ] Liu P, Kong J, Shi T, *et al.* RAPD analysis of genetic diversity in two Huang-bo Sea stock families of *Penaeus chinensis* [J]. Marine Fisheries Research, 2000, 21(1): 13- 21. [ 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄渤海沿岸种群亲本及子一代 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 13- 21. ]
- [ 11 ] Zou S M, Lou Y D, Sun X W, *et al.* Study on phylogeny relationship of grass carp, Boshi carp and 3 populations of common carp by RAPD fingerprinting [J]. J Fish Sci China, 2000, 7(1): 6- 11. [ 邹曙明, 楼允东, 孙效文, 等. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和 3 个地理种群鲤的亲缘关系[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 6- 11. ]
- [ 12 ] Sun J C, Lou Y D, Yao J H. Application of RAPD technology to analyze the genetic diversity of three breeds of red carp [J]. J Shanghai Fish Univ, 2001, 10(3): 207- 212. [ 孙景春, 楼允东, 姚纪花. 应用 RAPD 技术分析三种红鲤遗传多样性[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 13- 21. ]
- [ 13 ] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1979, 76(10): 5269- 5273.
- [ 14 ] Chen P Y, Huang Z M. SPSS 10. 0 for windows: practical guide [M]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2002. 102- 107. [ 陈平雁, 黄浙明. SPSS 10. 0 统计软件应用教程[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 102- 107. ]
- [ 15 ] Excoffier L. Analysis of molecular variance (AMOVA) version 2. 00. [Z] Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2002.
- [ 16 ] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1244- 1245.
- [ 17 ] Xia M. Research progress of genetic diversity [J]. Chin J of Ecol, 1999, 18(3): 59- 65. [ 夏铭. 遗传多样性研究进展[J]. 生态学杂志, 1999, 18(3): 59- 65. ]
- [ 18 ] Wu P, Lou Y D, Li S F. The karyotypes of *Trionyx sinensis* from the two different areas [J]. J Shanghai Fish Univ, 1999, 8(1): 6- 11. [ 吴萍, 楼允东, 李思发. 两个不同地域中华鳖的核型[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 6- 11. ]
- [ 19 ] Biecas J P, Pumo D E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass [J]. Heredity, 78, 32- 40.
- [ 20 ] Li S F, Cai W Q, Liu Z Z, *et al.* A comparative study on the variation of body shape and belly color pattern among seven populations [J]. J Fish China, 2004, 28(1): 15- 22. [ 李思发, 蔡完其, 刘至治, 等. 中华鳖七群体体形和腹部黑斑差异的比较研究[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 15- 22 ]