

韩晓磊, 顾 益, 潘林炜, 等. 太湖流域中华鳖不同群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 101–103.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.028

太湖流域中华鳖不同群体遗传多样性的 AFLP 分析

韩晓磊¹, 顾 益², 潘林炜¹, 沙永良², 徐建荣¹, 韩曜平¹

(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏常熟 215500; 2. 江苏省太仓市西湖水产专业合作社, 江苏太仓 215400)

摘要:基于 AFLP 分子标记技术对太湖流域中华鳖花鳖群体和普通群体进行了遗传多样性分析。结果表明, 用 6 对引物对 2 个群体 52 个中华鳖个体进行检测, 共获得 335 个位点, 其中多态位点 88 个, 平均多态位点比例为 26.27%。普通群体和花鳖群体的 Shannon's 指数分别为 0.377 9、0.229 2, Nei's 指数分别为 0.257 3、0.151 2, 显示 2 个群体遗传多样性处于同一水平; 中华鳖花鳖群体和普通群体的种间遗传相似度为 0.948 3, 遗传距离为 0.531; 通过 UPGMA 法对 2 个群体进行聚类分析显示, 两者基本能够分别聚类, 产生了一定的遗传趋异; 太湖流域 2 个群体中华鳖的遗传多样性相对贫乏, 花鳖群体与普通群体产生了一定程度的遗传分化, 可能分属于不同的亚种群。

关键词:中华鳖; AFLP; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q959.6⁺3; S917

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)12-0101-03

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术具有多态性丰富、显性表达、无复等位效应、灵敏度高、快速高效等优点, 可在较短时间内掌握大量遗传信息, 已被广泛应用于水生动物遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图谱的构建及系统分类等方面^[1-3]。中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 隶属于爬行纲 (Reptilia)、龟鳖目 (Testudoformes)、鳖科 (Trionychidae), 别称甲鱼、团鱼、王八等。中华鳖在我国分布广泛, 除西藏、青海外的其他各省 (市、区) 均有发现, 长江流域和华南地区分布较多^[4-5]。太湖花鳖属于中华鳖的地方特色品种, 主要生活在长江中下游特别是太湖流域, 因其背上有对称的黑色小圆斑点, 在野生环境中身体油绿, 裙边宽厚, 腹部有灰黑色块状花斑, 故此得名。太湖花鳖野性十足, 具有生长快、色泽艳、肉质好等特点, 并因其独特的风味和较高的营养价值深受消费者喜爱。江浙地区广泛养殖太湖花鳖, 市场前景良好。研究显示, 中华鳖还没有明确的亚种分类, 但却存在一些不同的地理群体, 其中太湖花鳖的分类地位也没有明确论断^[6]。本研究利用 AFLP 分子标记技术对太湖流域中华鳖花鳖群体和普通群体进行遗传多样性分析, 判断 2 个群体是否有遗传分化, 以期对太湖流域中华鳖不同群体间的种质鉴定和分类地位提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

2 个中华鳖群体样品采集于 2014 年 5—10 月期间, 其中花鳖群体采集于太湖流域的江苏省太仓地区 (简称 T, 野生群体, 图 1), 普通群体采集于太湖流域的江苏省常州地区 (简称

C, 野生群体, 图 2)。以中华鳖腿部肌肉组织为材料, 于无水乙醇中 -20 ℃ 保存备用, 分别取 30 尾 T 群体、22 尾 C 群体用于 AFLP 分析。

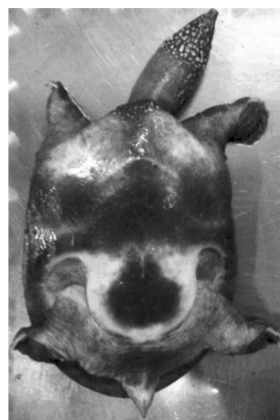


图1 花鳖群体



图2 普通群体

1.2 DNA 提取

中华鳖基因组 DNA 的提取参照韩晓磊等的方法^[7]。用分光光度计 (Thermo Scientific NanoDrop 2000) 测定基因组 DNA 的浓度, 并通过凝胶成像系统 (UVP Biospectrum 410) 检

收稿日期: 2016-07-16

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (编号: BE2013349)。

作者简介: 韩晓磊 (1981—), 男, 河北邯郸人, 硕士, 实验师, 主要从事淡水水生生物学研究。E-mail: hanxiaolei0724@163.com。

通信作者: 韩曜平, 博士, 教授, 主要从事水产品生态养殖技术与示范推广。E-mail: 975683768@qq.com。

测 DNA 的完整性,置 -20 ℃ 保存备用。

1.3 AFLP 分析

参照韩晓磊等的方法^[7]构建 AFLP 图谱,引物、人工接头由苏州金唯智生物科技有限公司合成,选择性扩增使用了 3 种 *EcoR* I 引物、3 种 *Mse* I 引物共 9 个引物组合,接头序列、预扩增引物序列、选择性引物序列见表 1。根据预试验结果,从扩增带数目适中、多态性高的引物组合中选取了 E38M51、E38M54、E42M51、E42M54、E44M48、E44M51 等 6 组引物组合。扩增产物在 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶上进行 60 W 恒功率高压电泳,对电泳结果进行银染检测。

| 表 1 AFLP 分析所用的接头、预扩增和选择性扩增引物 | | |
|------------------------------|------|-------------------------------|
| 引物类别 | 引物名称 | 序列 |
| <i>EcoR</i> I | E38 | 5′ - GACTGCGTACCAATTCAAC - 3′ |
| | E42 | 5′ - GACTGCGTACCAATTCAAG - 3′ |
| | E44 | 5′ - GACTGCGTACCAATTCACA - 3′ |
| <i>Mse</i> I | M48 | 5′ - GATGAGTCTGAGTAAAGG - 3′ |
| | M51 | 5′ - GATGAGTCTGAGTAACAA - 3′ |
| | M54 | 5′ - GCTGACTCTGAGTAACAT - 3′ |

1.4 数据分析

将电泳图谱中同一位置上有无 AFLP 条带情况进行统计,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,得出“0,1”原始数据矩阵。对 AFLP 数据进行分析统计的遗传学参数主要如下。

显性基因型频率 P_d 计算公式为:

$$P_d = n_i / n;$$
 (1)

式中: n_i 为位点 i 上有带的个体数, n 为总个体数。

多态位点比率 P 计算公式为:

$$P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%。$$
 (2)

遗传相似系数 S_{xy} 计算公式为:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y);$$
 (3)

式中: N_{xy} 是个体 x 和个体 y 共有位点数; N_x 、 N_y 分别是个体 x 和个体 y 总位点数。

遗传距离 D 计算公式为:

$$D = 1 - S;$$
 (4)

式中: S 为相似系数。

利用 POPGEN 32 软件计算遗传相似度和遗传距离等,利用 MEGA 3.0 软件构建 UPGMA 系统树。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增结果

由表 2 可见,经筛选,用 6 对引物组合对 T、C 2 个中华鳖群体总计 52 个样品 DNA 进行了 AFLP 扩增,选取 100 ~ 2 000 bp 的清晰条带,共计 335 条,以上片段中多态性条带为 88 条,多态位点比例为 26.27%。不同引物组合所扩增的位点数、多态性位点数相差不大,扩增条带数为 50 ~ 59 条,多态性条带为 12 ~ 16 条,多态位点比例为 24.00% ~ 28.57%。其中在 C、T 2 个群体中分别扩增出 76、75 条扩增条带,平均多态位点比例分别为 22.69%、22.39%。图 3 为引物 E44M48 在太湖流域中华鳖 2 个群体中的扩增图谱。

表 2 6 对引物的扩增结果

| 引物 | 位点数 (个) | 多态位点数 (个) | 多态率 (%) | T 群体 | | C 群体 | |
|--------|------------|--------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | | 多态性条带数(条) | 多态位点比例(%) | 多态性条带数(条) | 多态位点比例(%) |
| E38M51 | 53 | 14 | 26.42 | 13 | 24.53 | 11 | 20.75 |
| E38M54 | 50 | 12 | 24.00 | 10 | 20.00 | 11 | 22.00 |
| E42M51 | 56 | 16 | 28.57 | 15 | 26.79 | 13 | 23.21 |
| E42M54 | 59 | 16 | 27.12 | 11 | 18.64 | 15 | 25.42 |
| E44M48 | 59 | 15 | 25.42 | 13 | 22.03 | 12 | 20.33 |
| E44M51 | 58 | 15 | 25.86 | 14 | 24.14 | 12 | 20.69 |
| 合计 | 335 | 88 | 26.27 | 76 | 22.69 | 75 | 22.39 |

2.2 2 个中华鳖群体的遗传多样性和遗传距离分析

由表 3 可见,中华鳖花鳖群体和普通群体的 Shannon's 指数分别为 0.377 9、0.229 2,Nei's 指数分别为 0.257 3、0.151 2,可见花鳖群体的遗传多样性略低于普通群体,2 个群体遗传多样性处于同一水平。花鳖群体、普通群体的种间遗传相似度为 0.948 3,遗传距离为 0.053 1。

2.3 聚类分析

通过 Popgen 32 软件用 UPGMA 方法构建了 52 个太湖流域中华鳖个体的系统树(图 4)。中华鳖普通群体、花鳖群体基本能够分别聚类,出现了明显的遗传分化。

3 结论与讨论

3.1 遗传多样性分析

本研究选用 6 对引物对太湖流域中华鳖花鳖群体和普通群体共计 52 个个体进行 AFLP 检测,共获得 335 个位点,其中多态位点 88 个,平均多态位点比例为 26.27%,与已报道

的其他水生动物 AFLP 数据^[7-10]对比发现,太湖流域中华鳖群体的遗传多样性处于较低水平。通过分析 Shannon's 指数、Nei's 指数,得出了同样的结论。中华鳖花鳖群体、普通群体的平均多态位点比例、Shannon's 指数、Nei's 指数均无明显差异,判定两者遗传多样性处于同一水平。

自古以来中华鳖就是名贵的食物和药材,近代中华鳖的人工养殖发展非常迅速^[11]。随之而来的是野生甲鱼被捕获用于食用与养殖,导致了自然种群混杂,群体多样性不断降低,中华鳖种质严重退化,野外个体数量不断减少^[12]。日前世界自然保护联盟(IUCN)发布的最新版全球濒危物种红色名录,已将中华鳖列入濒危物种名单^[13]。基于以上情况,必然导致中华鳖野外种群形成小群体,加速了繁殖群体的日益缩小,增加了近交频率的发生,容易出现小群体效应,最终造成 2 个中华鳖群体遗传多样性处于较低水平,这也从基因水平说明了其处于濒危状态的现状,因此开展对中华鳖野生群体遗传多样性的保护工作势在必行。

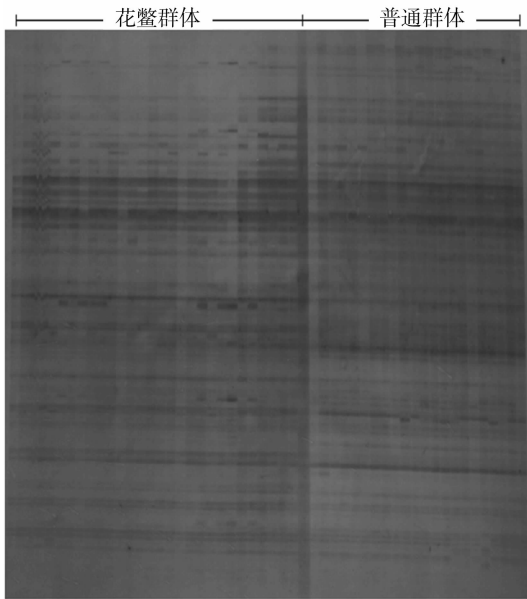


图3 引物 E44M48 在中华鳖群体的扩增图谱

表 3 中华鳖种群内及群体间 Shannon's 指数和遗传多样性指数

| 群体 | Shannon's 指数 | Nei's 指数 |
|-----|--------------|----------|
| C | 0.377 9 | 0.257 3 |
| T | 0.229 2 | 0.151 2 |
| C-T | 0.385 2 | 0.264 6 |

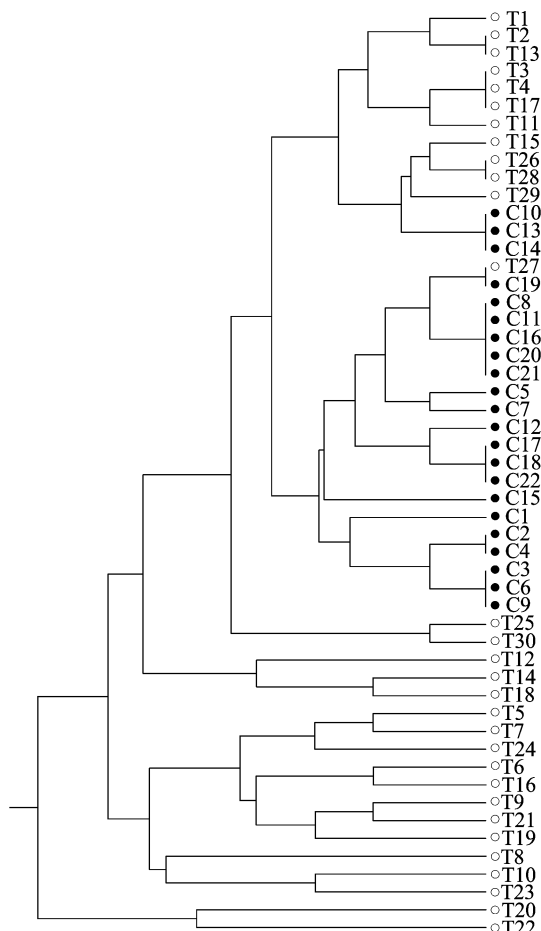


图4 利用 UPGMA 方法构建52个中华鳖个体系统树

3.2 群间遗传分化分析

Thorp 研究认为,种群间的遗传距离为 0.03 ~ 0.20(遗传相似度是 0.80 ~ 0.97)^[14]。本研究中,中华鳖 2 个群体的遗传距离为 0.053 1,表明花鳖群体、普通群体之间的遗传分化处于群间差异,还未达到种间水平。聚类分析表明,中华鳖 2 个群体分别聚类,已经存在明显歧化,揭示花鳖群体与普通群体已经形成各自独立的遗传结构,两者产生了明显的遗传分化。太湖花鳖属于中华鳖的地方特色品种,与中华鳖普通品种在形态上存在较大不同,本研究中两者遗传分化程度虽然还没有达到种间水平,但已经产生了明显的遗传趋异,可能分属于不同的亚种群,这与研究关于不同群体中华鳖形态多样性分析结果一致。当然,中华鳖花鳖群体与普通群体之间分类关系的确定,除了分子和形态方面的研究,还有赖于器官组织和细胞水平方面的研究予以论证。

参考文献:

- [1] 张海英,许勇,王永健. 分子标记技术概述(下)[J]. 长江蔬菜,2001,2(3):15-16.
- [2] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting; European Patent Office, 92402629.7[P]. 1993-10-05.
- [3] 陈省平. AFLP 标记在扇贝种质鉴定及其遗传结构分析中的应用[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [4] Golubtsov A S, Berendzen P B. Morphological evidence for the occurrence of two electric catfish (*Matapterurus*) species in the White Nile and Omo-Turkana systems (East Africa) [J]. J Fish Bio, 1999, 55 (3):492-505.
- [5] Gibson A R, Baker A J, Moeed P. Morphometric variation in introduced populations of the common myna (*Aeridotheres tristis*): an application of the jackknife to principal component analysis [J]. Systematic Zoology, 1984, 33(4):408-421.
- [6] 唐伟. 姚江水系中华鳖种质特征研究[D]. 上海:上海海洋大学,2015.
- [7] 韩晓磊,徐建荣,李小蕊,等. 鲢鱼群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 南京师大学报:自然科学版,2009,32(1):110-114.
- [8] 匡友谊,佟广香,尹家胜,等. 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国水产科学,2007,14(4):615-621.
- [9] 陈炼. 中国水域江豚和中华白海豚的保护遗传学研究[D]. 南京:南京师范大学,2009.
- [10] Wang W, Chen L Q, Yang P, et al. Assessing genetic diversity of populations of topmouth culter (*Culter alburnus*) in China using AFLP markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2007, 35 (10):662-669.
- [11] Chu B. The technology of using ground heat for soft-shelled turtle overwintering culture [J]. Proceedings of the International Symposium of Agricultural Engineering, 1989, 89:993-994.
- [12] Eisenhour D J. Systematics of *Macrhybopsis tetranema* (Cyprini-forms; Cyprinidae) [J]. Copoia, 1999 (4):969-980.
- [13] IUCN. The 2016 IUCN red list of threatened species [DB/CD]. 2016.
- [14] Thorp J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [J]. Annual Review of Ecology Systematics, 1982, 13(1):139-168.