

乌龟遗传多样性的 RAPD 分析

朱新平^{1,2} 杜合军² 周 莉¹ 李名友¹ 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 中国科学院研究生院, 武汉 430072;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要:运用 RAPD 技术对乌龟的遗传多样性进行了分析。用 20 个随机引物对 24 个个体的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增, 一共扩增出 3288 条 DNA 片段, 平均每个个体扩增出 137 条带。在检测到的 137 个位点中, 多态位点数为 119 个, 占 86.9%, 标记的分子量在 0.2kb—3kb 之间。个体间最大的遗传距离为 0.467, 个体间最小的遗传距离为 0.168。24 个个体的平均遗传距离为 0.324+0.0631。表明乌龟的遗传多样性水平较高。采用类平均聚类法 (NJTREE) 构建了 24 个个体相互关系的分支图。24 个个体被分为几个类群, 显示种内遗传差异较大, 可能存在不同种群。本研究为乌龟的种质保护、合理开发利用以及选择育种提供了新的分析参数。

关键词: 乌龟; 遗传多样性; RAPD 分析

中图分类号: Q173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0167-05

乌龟 (*Chinemys reevesii*) 分类上隶属龟鳖目、龟科、乌龟属, 在中国分布较广^[1], 是常见的水生龟种, 也是目前国内养殖量最大的本地品种之一。近年来乌龟作为养殖品种开始受到人们的重视。人们逐渐开展繁育繁殖方面的研究工作, 但与其有关的遗传研究较少, 仅仅在染色体组型、同工酶及系统发生方面有些报道^[2-4]。乌龟的种质状况以及遗传背景尚不清楚。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是建立在 PCR 基础上的分子标记技术, 具有简便、准确、快速的特点, 既有大量的随机引物可供选择, 又不受种属的限制, 因此被广泛地应用于虾^[5,6]、鱼^[7,8]、龟^[9]等物种遗传多样性的分析与研究。本文利用 RAPD 技术在分子水平上对乌龟进行遗传分析, 试图在其进行规模化养殖之前了解它们的遗传结构以及遗传多样性, 以指导如何保护其种质资源, 保护其基因库, 不致于在规模化养殖后造成基因的流失。同时为乌龟合理开发利用以及选择育种提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 材料 乌龟由湖北武汉市多福农庄提供。11 雌 13 雄, 共 24 只, 体重在 74g—800g 之间。材料在

湖北省内收集, 暂养在多福农庄, 血缘关系不详。

1.2 基因组 DNA 的提取和定量 解剖样本, 从心脏抽取心血, 基因组总 DNA 从龟血中提取。提取方法参照 Genomic DNA 纯化试剂盒 (生工) 的操作程序。主要过程为: 500μL 血液中加入 1mL 无菌水, 5000r/min, 离心 2min, 用 200μL TE 悬浮血细胞, 加 400μL 细胞裂解液, 3μL proteinase K 混匀, 置 65℃ 5—10min, 加入 600μL 氯仿, 混匀, 用台式离心机 (Microfuge^R centrifuge, BECKMAN) 10,000r/min 离心 2min。取 500μL 上层清液, 置无菌 1.5mL 离心管中, 加入 500μL precipitation solution 后, 混匀, 室温放置 2min, 10,000r/min, 高速离心 2min, 吸掉溶液, 加入 100μL 1.2mol/L NaCl, 轻轻振荡直至 DNA 样品完全溶解, 加入 3μL RNase A, 置 37℃, 5—10min 去除 RNA, 加入 300μL 冷乙醇, -20℃ 放置 10min, 10,000r/min, 高速离心 3—4min, 弃乙醇, 用 70% 乙醇洗一次, 倒置室温干燥 10min。DNA 用 100μL 水溶解。DNA 质量和浓度参照周莉等^[10]的方法, 通过琼脂糖凝胶 (含 0.5μg/mL 的溴化乙锭) 电泳 (5—10v/cm) 来鉴定, DNA 样品保存在 -80℃ 冰箱内备用。

1.3 RAPD 反应 在实验前, 优化了适合本研究的扩增和电泳条件, 获得丰富的可重复的 DNA 图谱。

收稿日期: 2003-12-17; 修订日期: 2004-02-09

基金项目: 广东省海洋与渔业局重点科研项目 (2001A09); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题基金 (KSCX2-SW-303) 资助

作者简介: 朱新平 (1964—), 男, 湖南邵阳人; 在职博士, 副研究员; 研究方向: 种质资源与遗传育种。E-mail: xinpingshu@tom.com

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

RAPD 反应体系的总体积为 25 μ L, 内含 20ng 模板 DNA, 0. 2 μ M 引物, 0. 5 单位 Taq 酶(Biostar international), 0. 1 μ mol/L dNtp(华美) 和 1 $\times$ Taq 酶反应缓冲液(Biostar international)。选用的引物为生工公司生产的 S1001-S1030 中的 20 个。PCR 反应在 PCR System 9600 扩增仪(美国 PE 公司) 上进行, 反应程序为: 在 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min 后, 进行 38 个扩增循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 37. 5 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min20s, 最后一次循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶(含 0. 5 μ g/mL 的溴化乙锭) 分离, 扩增片段大小通过与 λ DNA/ Hind III+ EcoR I 分子大小标记(华美) 比较而得以记录。电泳凝胶通过白光/ 紫外光图像扫描系统(Ultra-Violet Products) (GDS 8000 complete Gel Documentation & Analysis System) (美国 Olypia 公司) 分析。

1.4 数据处理 在所扩增的 20 个引物中, 产生了重复的、清晰的扩增图谱。利用获得的数据, 采用计算机软件 RAPDistance(1. 04 版) 进行分析。无论是共有的或是特异的片段都计入数据分析, 以 1 或 0 分别表示扩增片段的有或无, 24 个个体的距离矩阵和平均遗传距离分别根据 Nei 和 Li^[11] 及 Apostol^[12] 的公式计算获得。根据遗传距离矩阵, 显示 24 个个体相互关系的分支图通过 RAPDistance(1. 04 版) 软件中的 NJTREE 构建^[12]。

2 结果

2.1 RAPD 扩增

使用 S 系列的 20 个随机引物, 对乌龟的湖北地理群的 24 个个体进行 PCR 扩增, 均可产生特定的扩增带型。每个引物可产生 3—12 条的谱带。具体统计见表 1。20 个引物的 RAPD 产物的总标记数达 137 条, 其中 119 条为多态数, 占 86. 9%, 标记的分子量在 0. 2—3kb 之间。

2.2 乌龟湖北地理群的遗传多样性

根据软件 RAPDistance(1. 04 版) 进行分析, 得到乌龟 24 个个体的遗传距离 P 值矩阵(表 2)。任意两个个体的 P 值在 0. 467—0. 168 范围之内。该地理种群 24 个个体的平均遗传距离为 0. 324 $\pm$ 0. 0631。

乌龟的 RAPD 扩增谱带变异较大, 20 个引物均有多态位点(图 1)。在检测到的 137 个 RAPD 标记中, 仅有 18 个标记(占 13. 1%) 在 24 个个体间表现一致性。

表 1 S 系列引物序列及 RAPD 扩增情况			
Tab 1 Primers sequences of S serials and the results of RAPD			
引物 Primer	5'—3' 序列 5'—3' Sequence	产物的标记数 Markers of product	
		总数 Total	多态数 Polymorphic
S1002	CACTTCGGCT	3	3
S1003	GGTACTGCC	3	1
S1004	CTCCCAGAC	7	6
S1008	TTCCTGTGCC	6	5
S1009	AGAACCAGG	6	6
S1010	GGGATGACCA	9	6
S1011	TCCGCTGAGA	7	6
S1012	TCCAACGGCT	5	5
S1013	TGAGTCGCA	10	10
S1014	TGTGGCCGAA	7	6
S1015	CTACAGCGAG	11	11
S1018	GGGCTAGTCA	8	6
S1019	GGCAGTCTC	6	5
S1020	GGAAGGTGAG	6	4
S1021	GGCATCGGCT	6	5
S1022	AGCCGTCAG	12	12
S1023	GGTCCAAAG	7	6
S1025	GTCGTAGCGG	3	2
S1026	TGCCGCACTI	8	8
S1030	TCGGGGCATC	7	6
合计 Total		137	119

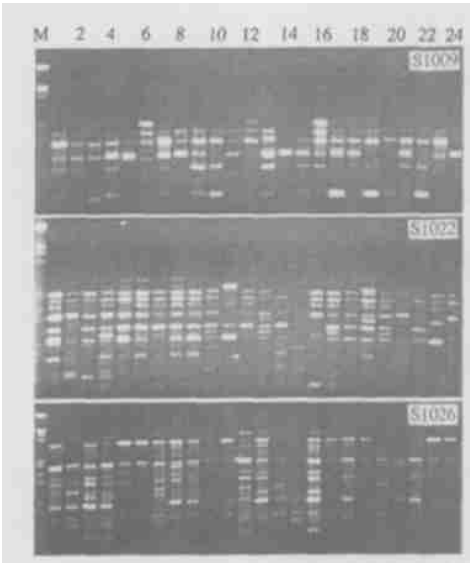


图 1 24 个乌龟个体扩增的 3 组典型 RAPD 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of 3 typical RAPD band patterns produced by S1009, S1022 and S1026 primers with 24 individuals of *C. reevesii*

表 2 乌龟湖北地理群 24 个个体的随机扩增多态 DNA 片段遗传距离
Tab. 2 The genetic distances of 24 individuals of *C. reevesii* distributed in Hubei obtained by RAPD

个体数 Individuals	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0.0000																							
2	0.2482	0.0000																						
3	0.1679	0.2555	0.0000																					
4	0.2701	0.2117	0.3066	0.0000																				
5	0.3066	0.3650	0.2555	0.4161	0.0000																			
6	0.4088	0.4234	0.4161	0.4453	0.2628	0.0000																		
7	0.1898	0.2336	0.2263	0.2555	0.2628	0.4088	0.0000																	
8	0.3219	0.3942	0.2993	0.4015	0.2628	0.3796	0.3066	0.0000																
9	0.2774	0.3212	0.3431	0.3431	0.3796	0.3942	0.2774	0.3212	0.0000															
10	0.2701	0.2993	0.3358	0.2774	0.3431	0.3723	0.2409	0.3723	0.2555	0.0000														
11	0.3723	0.4599	0.3650	0.4964	0.2701	0.2993	0.4015	0.2555	0.4161	0.3358	0.0000													
12	0.3139	0.2993	0.3213	0.3504	0.2847	0.3431	0.2555	0.2847	0.3577	0.2774	0.3066	0.0000												
13	0.3504	0.3796	0.3431	0.4161	0.3066	0.3212	0.3066	0.3650	0.3650	0.2993	0.3139	0.2847	0.0000											
14	0.3577	0.2847	0.3650	0.3212	0.4161	0.3723	0.3869	0.4453	0.3577	0.3212	0.3796	0.3650	0.3723	0.0000										
15	0.4234	0.2920	0.4745	0.3577	0.4380	0.3942	0.4234	0.4964	0.3650	0.3285	0.4015	0.3869	0.4234	0.1971	0.0000									
16	0.3358	0.3942	0.3139	0.4161	0.2920	0.2920	0.3650	0.2920	0.3942	0.4161	0.2847	0.2993	0.2774	0.3577	0.4234	0.0000								
17	0.3139	0.4015	0.3358	0.4234	0.2555	0.2555	0.3431	0.3431	0.3139	0.3358	0.2190	0.3796	0.2993	0.3504	0.4015	0.2555	0.0000							
18	0.2482	0.3066	0.2701	0.3577	0.2920	0.3650	0.2336	0.3212	0.2920	0.3139	0.3285	0.2701	0.2920	0.3723	0.4818	0.2920	0.2993	0.0000						
19	0.2044	0.3066	0.2555	0.3723	0.2190	0.3942	0.2482	0.2482	0.2920	0.2993	0.3139	0.3431	0.3650	0.4015	0.4380	0.3504	0.2993	0.2920	0.0000					
20	0.3212	0.3942	0.3431	0.3723	0.2482	0.2482	0.3650	0.3650	0.3942	0.2847	0.3139	0.3285	0.2482	0.3723	0.3504	0.3066	0.2847	0.3212	0.3650	0.0000				
21	0.2847	0.2993	0.2774	0.2920	0.2993	0.3723	0.2993	0.4307	0.3285	0.2628	0.3942	0.3504	0.3431	0.3358	0.3869	0.3577	0.3358	0.2701	0.3285	0.3431	0.0000			
22	0.2044	0.2044	0.2117	0.2701	0.2774	0.3650	0.2336	0.3942	0.3066	0.2409	0.3723	0.2847	0.3358	0.2847	0.3796	0.3942	0.3431	0.2190	0.2628	0.3066	0.2117	0.0000		
23	0.2110	0.3066	0.2263	0.3723	0.1898	0.3504	0.2482	0.3212	0.3358	0.3285	0.3285	0.3285	0.3358	0.4161	0.4672	0.3358	0.3139	0.2774	0.2044	0.2628	0.2555	0.2190	0.0000	
24	0.3285	0.3285	0.3212	0.4234	0.2263	0.3431	0.2993	0.2993	0.3577	0.3212	0.2482	0.2628	0.3285	0.3942	0.3869	0.3285	0.3066	0.2847	0.2409	0.3139	0.3212	0.2847	0.1971	0.0000

通过 RAPDistance 软件中的 NJTREE 构建了乌龟 24 个个体之间相互关系的分支聚类图(图 2)。从分支图可以看出, 24 个个体比较分散, 主要聚成了两个群体。样本 2、4、14、15、9、10 聚集成一个群体, 其他 18 个个体则聚成另一群体。在 18 个个体聚成的群体里又分为几个小类群。由于实验材料采集于湖北省的不同地区, 而个体的遗传距离较大, 表明不同地区可能有不同的种群存在。目前至少说明了这样一个事实, 即乌龟种内的遗传差异较大。

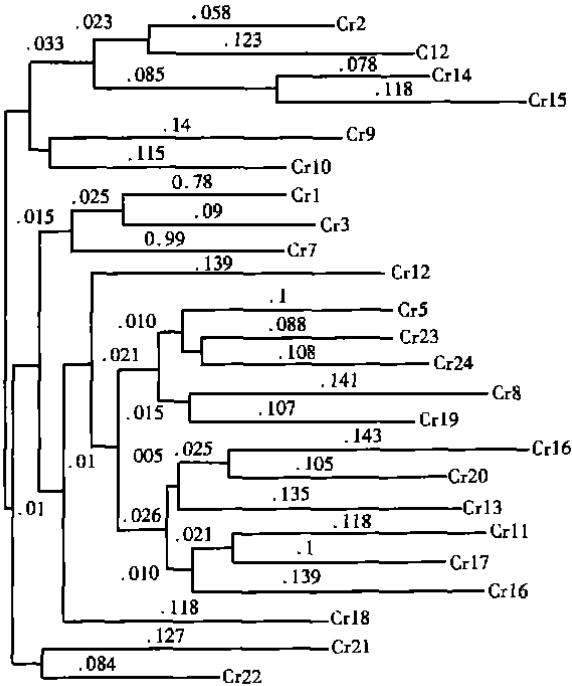


图 2 根据乌龟 24 个个体的扩增结果构建的聚类图
Fig.2 The phlogenetic tree of the 24 individuals of *C. reevesii* obtained by NJTREE analysis in RAPDistance program

3 讨论

遗传多样性代表物种种群之内和种群之间的遗传结构的变异, 各个种群由于突变、自然选择或其他原因, 往往在遗传上不同。特别是龟类, 由于地理隔离, 遗传的差异更大。对物种的遗传多样性及种群结构进行研究, 是为了最大限度地维持种内的遗传多样性水平, 维持物种和种群的自然繁殖能力、进化潜力, 确保种质资源的持续性利用。根据 RAPD 技术分辨率高, 能够迅速提供遗传分析中大量遗传标记的特点, 遗传距离及聚类分析揭示了乌龟的遗传变异水平。乌龟种群的平均遗传距离为 0.324 ± 0.0631 , 即是说种群内个体的相似程度为 67.6%。而多态位点的百分数为 86.9%。相对其他物种来说, 它的遗传变异水平是较高的。如中国对虾(*Pe-*

naeus chinensis) 黄、渤海沿岸地理群的平均遗传距离为 0.0941, 多态位点的百分数为 36.8%^[5], Garcia^[6] 用 6 个引物检测的南美白对虾(*P. vannamei*) 的 4 个群体和家系, 测得的多态位点百分数是 58.75%。鲮鱼的多态位点百分率为 35.7%^[7]。罗非鱼种群内个体间的相似率分别是尼罗罗非鱼为 0.730 ± 0.12 , 莫桑比克罗非鱼为 0.78 ± 0.12 和奥利亚罗非鱼为 0.87 ± 0.07 ^[8]。吴平等^[4] 利用 12SrRNA 基因片段的序列分析研究亚洲淡水陆生龟鳖类的系统发生时, 在 23 种龟中检测到 4 种龟有种内差异。而这种差异大于许多动物 12SrRNA 序列的种间差异。这些可能与地理隔离, 以及龟类的多父现象^[13-17] 有关。龟类动物的遗传变异水平较高, 有助于龟类动物的生存与延续。龟类动物能够长久地在地球上生活, 可能与其能够维持种群内高水平遗传多样性有一定的关系。

在 20 个引物扩增的 RAPD 图谱中, 没有发现任何两个个体拥有完全相同的图谱, 这表明 RAPD 技术具有良好的分辨率。通过对一些野生物种的监测, 可以评价自然灾害和人类实践干预对野生种质资源所带来的遗传学变化, 从而制定和采取相应的管理和保护措施。本文对乌龟的遗传分析, 为今后其种群的种质保护, 合理开发利用以及选择育种提供了基础数据。

参考文献:

- [1] Zhao E.M. Studies on taxonomy and distribution of Chinese chelonians [J]. *Sichan Journal of Zoology*, 1997, 15(Suppl): 1-26 [赵尔宓. 中国龟鳖动物的分类与分布研究. 四川动物, 1997, 15(增刊): 1-26]
- [2] Guo C.W. A study on chromosomes of Chinese chelonians [J]. *Sichan Journal of Zoology*, 1997, 15(Suppl): 93-96 [郭超文. 中国龟鳖类染色体研究. 四川动物, 1997, 15(增刊): 93-96]
- [3] Nie L.W., Guo C.W., Wang M. A comparative study on isozymes of three freshwater turtle species in China [J]. *Sichan Journal of Zoology*, 1997, 15(Suppl): 115-120 [聂刘旺、郭超文、汪鸣. 我国三种龟的同工酶比较研究. 四川动物, 1997, 15(增刊): 115-120]
- [4] Wu P., Zhou K.Y., Yang Q. Phylogeny of Asian freshwater and terrestrial turtles based on sequence analysis of 12SrRNA gene fragment [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, 45(3): 332-338 [吴平、周开亚. 亚洲淡水和陆生龟鳖类 12SrRNA 基因片段的序列分析和系统发生研究. 动物学报, 1999, 45(3): 332-338]
- [5] Liu P., Kong J., Shi T., et al. RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai Seas [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 22(5): 88-93 [刘萍、孔杰、石拓、庄志猛, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理

- 群的 RAPD 分析. 海洋学报, 2000, **22**(5): 88—93]
- [6] Garcia K G. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**(5): 270—280
- [7] Zheng G M, Zhu X P, Zhang Y, *et al.* Genetic differential research on the Mud Carp (*Cirrhina molitorella*) in different parts of Pearl River Valley [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, **9**(2): 178—182 郑光明、朱新平、张跃, 等. 珠江流域不同江段鳊鱼遗传差异研究. 农业生物技术学报, 2001, **9**(2): 178—182]
- [8] Dinesh K R, Lim T M, Chan W K, *et al.* Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of Tilapia [J]. *Aquaculture*, 1996, **4**(1): 19—30
- [9] Trojanowski Jan, Marlene Snyder, and Tom Herman. Assessment of genetic variation of snapping turtle (*Chelydra serpentina*) populations using RAPD analysis, <http://ace.acadiau.ca/science/boil/honours/biofeedback/99/trojanowsk>
- [10] Zhou L, Fan L C, Gui J F. RAPD analysis of incorporation of heterologous genetic materials in multiple species of silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 1998, **22**(4): 301—306 [周莉、樊连春、桂建芳. 银鲫复合种外源遗传物质整合的 RAPD 分析. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 301—306]
- [11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **76**: 5269—5273
- [12] Apostol B L. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Theor Appl Genet.* 1993, **86**: 991—1000
- [13] Galbraith. D A., White B N., Brooks R J, *et al.* Multiple paternity in clutches of snapping turtles (*Chelydra serpentina*) detected using DNA fingerprints [J]. *Canadian J. Zool.*, 1993, **71**(2): 318—324
- [14] Kichler K, Holder M T, Davis S K, Marquez M R, *et al.* Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling [J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**: 819—830
- [15] Rhen T, Lang J W. Phenotypic plasticity for growth in the common snapping turtle: effects of incubation temperature, clutch, and their interaction [J]. *American naturalist*, 1995, **146**: 726—747
- [16] Sugg D W, Chesser R K. Effective population sizes with multiple paternity [J]. *Genetics*, 1994, **137**: 1147—1155
- [17] Valenzuela, N. Multiple paternity in side-neck turtles *Palaeomenis es-pansa*: evidence from microsatellite DNA data [J]. *Molecular Ecology*, 2000, **9**: 99—105

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF CHINESE THREE-KEELED POND TURTLE (*CHINEMYS REEVEsii*) BY RAPD

ZHU Xin-Ping^{1,2}, DU He-Jun², ZHOU Li¹, LI Ming-You¹ and GUI Jian-Fang¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2 Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380)

Abstract: Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii* Gray) is a member of the family *Emydidae* and widely ranges in southern China, especially in the regions of the lower and middle Yangtze River. It has high values for food, traditional Chinese medicine and pet trade, and is one of the turtles for aquaculture in China. But the genetic background of Chinese three-keeled pond turtle is still not very clear. In order to realize its population genetic structure and the diversity for the conservation of its germ plasm and prevention of gene loss, genetic diversity analysis was carried out using RAPD-PCR technique.

In this paper, genetic diversity of 24 individuals of Chinese three-keeled pond turtle from Hubei province was analyzed by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, using 20 10-nucleotide-long primers. Twenty primers produced 3288 well-amplified DNA fragments with reproducible banding patterns and averaged 137 DNA fragments in one individual. 119 of 137 loci detected are polymorphic, amounting to 86.9%. The DNA fragments were from 0.2 kb to 3 kb. The genetic distance between two individuals was from 0.168 to 0.467. The average genetic distance was 0.324 ± 0.0631 among the 24 individuals. The phylogenetic tree of the 24 individuals was obtained by NJTREE analysis in the RAPDistance program and the 24 individuals were divided into several clusters and it indicated the turtle maybe have two populations at least. In conclusion, genetic diversity of Chinese three-keeled pond turtle was high.

Key words: Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii*); Genetic diversity; RAPD analysis