

微卫星标记分析乌龟养殖群体的遗传多样性

章芸¹, 俞丹娜¹, 杜卫国², 郑荣泉^{1*}, 杨光³

(1. 浙江师范大学生态研究所, 浙江 金华 321004;

2. 杭州师范学院生命科学学院, 浙江 杭州 310036;

3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 利用8个微卫星标记对7个乌龟养殖群体进行了遗传多样性和遗传结构的检测。结果显示,7个养殖群体都表现出较高的多态性,8个位点共检测出130个等位基因,范围在9~26,平均16.25;其多态信息含量(PIC)范围为0.57~0.92,平均值为0.71;观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为0.30~0.87和0.60~0.93。分子变异方差分析(AMOVA)结果表明,遗传变异5.91%来自群体间,84.29%来自群体内部,两两群体间 F_{ST} 值在0.0143~0.1127,其中57.14%的两两群体间无分化,42.86%的两两群体间出现了中等程度的分化。哈迪-温伯格平衡检测表明,8个位点中有5个位点显著或极显著的偏离了哈迪-温伯格平衡,推测各群体中出现了近交繁殖的现象。7群体间遗传距离为0.1066~0.6468,UPGMA聚类分析表明,湖北荆州群体单独聚为一支,其余6个群体聚为另一支。另外,7个群体都存在特有等位基因,提示群体间等位基因扩散受到一定程度的限制,同时在育种上,可以作为亲本选育的一个重要参考指标。

关键词: 乌龟; 遗传多样性; 微卫星

中图分类号: S 917

文献标识码: A

乌龟(*Chinemys reevesii* Gray, 1831)俗称金龟、草龟等,隶属于龟鳖目(Plestudinata)、淡水龟科(Bataguridae)、乌龟属(*Chinemys*),主要分布在中国,日本和朝鲜,其中80%以上的种群分布在我国境内。乌龟是我国龟鳖类中分布最广且最常见的种类^[1],其肉不但可食用,亦是我国的传统中药材^[2],具有极高的药用和经济价值。为了满足市场的巨大需求,到20世纪90年代中期我国南方许多省市已先后建立了一批乌龟养殖场^[3],由于乌龟生长迟缓,其市场供给量还远远不能满足人们的需求。

目前对于乌龟的研究集中在肌肉营养价值评定^[2],尿液主成分测定^[4],胚胎发育^[5],人工孵化^[6-7]和性别决定^[8-9]等方面,关于乌龟种群遗传学方面的研究鲜有报道,朱新平等^[10]利用RAPD分子标记研究了单个种群24个乌龟个体

的遗传多样性,而对乌龟其种质资源状况和遗传信息尚缺乏全面的了解,这影响了乌龟养殖业的规模化发展。有效的遗传数据不仅可以为龟类的规模化养殖、杂交育种及管理等方面提供科学建议,而且也可以为龟类野生资源的保护提供理论基础。因此,开展乌龟群体遗传多样性方面的研究显得非常迫切。

微卫星标记作为一种共显性标记,具有分布广泛、多态性高、通用性好、检测方便等优点,倍受各学者的青睐^[11-12]。本研究采用本实验室自主筛选的8个微卫星标记来研究乌龟养殖群体的遗传多样性及其遗传结构,为乌龟的遗传资源保护和遗传育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集及基因组DNA的提取

研究所用的102个乌龟个体分别取自7个养

收稿日期:2010-05-15 修回日期:2010-09-07

资助项目:国家自然科学基金项目(30970362)

通讯作者:郑荣泉, E-mail: zhengrq@zjnu.cn

殖场。其中湖南益阳杨凌坳村养殖场(HNY Y) 14 个,湖南汉寿养殖场(HNHS) 15 个,湖北荆州养殖场(HBJZ) 13 个,江苏苏州生态龟鳖养殖场(JSSZ) 15 个,上海青浦区养殖场(SH) 15 个,浙江海宁龙头阁两栖爬行动物研究所(ZJHN) 15 个,江西弋阳金龟王实业有限责任公司(JXYY) 15 个(图 1)。

采用标准的蛋白酶 *K* 消化和酚/氯仿抽提 DNA 的方法^[13],从乌龟的尾尖组织中提取基因组 DNA。

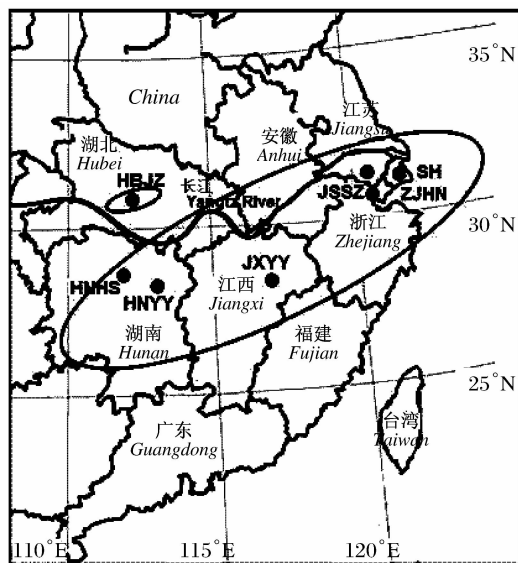


图 1 采样点分布图

Fig. 1 Map of the sampling localities

1.2 引物信息

研究采用的 8 对微卫星引物参照 Ye 等^[14] 的报道,并由上海生工生物工程有限公司合成,其中一条微卫星引物的 5' 端需加上一段没有远红外荧光标记的 M13 序列。

1.3 基因分型

PCR 反应在 15 μ L 的体系中进行,包括大约 50 ~ 100 ng 基因组 DNA, 7.5 μ L Ex *Taq* premix Buffer, 0.4 μ L 引物(包括上下游), 0.4 pmol 荧光标记的 M13 引物[either IRD700 or IRD800 (LI-COR)], 加 ddH₂O 补齐到 15 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 紧接着 32 个循环的 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 位点特异性退火温度(50 ~ 62 $^{\circ}$ C)^[14] 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 8 min。PCR 扩增产物在 LI-COR4300 遗传自动分析仪上进行基因分型,配合使用内置 STR 分子量

标准(STR Marker, LI-COR Bioscience) 和软件 SAGA^{GT} 自动判读条带,辅以人工校正。

1.4 数据分析

对 7 个群体进行哈迪 - 温伯格平衡检测和遗传多样性分析。利用 GENEPOP version 3.4^[15] 软件进行哈迪 - 温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 检验,根据马可夫链算法(Markov chain algorithm)得到精确 *P* 值(P_{H-W}),用来判断杂合不足(heterozygote deficiency) 和杂合过剩(heterozygote excess) 情况。同时对位点间进行连锁不平衡检验(linkage disequilibrium, LD)。另外,通过 Genetix version 4.05^[16] 计算各个位点的等位基因数目(number of alleles, N_A),观测杂合度(observed heterozygosities, H_O) 和期望杂合度(expected heterozygosities, H_E)。用软件 Microsatellite Toolkit^[17] 计算各群体在各个位点的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

通过多个方法揭示 7 群体间的遗传分化和遗传结构。先利用软件 Genetix version 4.05 计算群体间的遗传分化程度和基因流,包括总的 F_{ST} 值以及两两种群间的 F_{ST} 值和总的 N_m 值以及两两种群间的 N_m 值。再应用 Arlequin 3.11^[18] 进行分子变异方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA),估测遗传变异在群体内和群体间的分配情况。之后利用 POPGENE version 1.32^[19] 软件包计算群体间的 Nei 氏无偏遗传距离和遗传相似性系数,并用 PHYLIP 3.5 software package^[20] 软件按照 Nei 氏无偏遗传距离进行 UPGMA 聚类。

2 结果

2.1 群体间的遗传变异

等位基因数 N_A 、观测杂合度 H_O 、期望杂合度 H_E 、多态信息含量 PIC、哈迪 - 温伯格平衡检验的 *P* 值等信息详见表 1。结果表明,在 8 个位点中共检测到 130 个等位基因,最少的为 9 个(Cre107 和 Cre46),最多的为 26 个(Cre48)。各位点的多态信息含量在 0.57 ~ 0.92,平均为 0.71。从各群体含有的等位基因数情况来看,湖南汉寿群体的平均等位基因数最少($N_A = 6.13$);江苏苏州群体的平均等位基因数最多($N_A = 8.75$)。另外,湖南汉寿群体具有相对较低的期望杂合度(0.67),上海群体具有最高的期望杂合度(0.78)。

另外在这8个位点当中,还检测到44个特有等位基因。其中湖南汉寿群体(HNHS)含有一个特有等位基因,上海群体(SH)含有较高的特有等位基因数目,为14个(表2)。

通过连锁不平衡的检测显示,各位点之间没有出现连锁不平衡现象($P > 0.05$)。8个微卫星位点分别对7个乌龟群体进行了56次哈迪-温

伯格平衡检验。其中19.64% (11/56)的检测结果表明为显著的偏离($P < 0.05$),14.29% (8/56)表现为极显著偏离($P < 0.01$),其余的66.07% (37/56)符合哈迪-温伯格平衡($P > 0.05$)。将各群体合并为一个集合种群来看,则8个位点中有5个位点显著或极显著的偏离了哈迪-温伯格平衡(表1)。

表1 7个乌龟群体的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量、 P 值
Tab.1 Allele number (N_A), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, polymorphism information content (PIC) and P value for testing HWE (P_{H-w}) in seven *C. reevesii* stocks

位点 loci		湖南益阳 HNY ($n=14$)	湖南汉寿 HNHS ($n=15$)	湖北荆州 HBJZ ($n=13$)	江苏苏州 JSSZ ($n=15$)	上海 SH ($n=15$)	浙江海宁 ZJHN ($n=15$)	江西弋阳 JXYY ($n=15$)	所有群体 all stocks
Cre9	N_A	4	2	4	4	6	6	5	11
	H_O	0.29	0.20	0.23	0.14	0.43	0.33	0.46	0.30
	H_E	0.50	0.34	0.21	0.59	0.69	0.60	0.64	0.60
	PIC	0.46	0.31	0.21	0.54	0.66	0.57	0.60	0.57
	P_{H-w}	0.03	0.03	1.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
Cre48	N_A	7	7	13	18	8	7	7	26
	H_O	0.71	0.87	0.85	1.00	1.00	0.71	0.93	0.87
	H_E	0.81	0.78	0.91	0.93	0.78	0.80	0.83	0.89
	PIC	0.78	0.75	0.90	0.93	0.76	0.77	0.80	0.88
	P_{H-w}	0.31	0.87	0.38	1.00	0.74	0.20	0.34	0.72
Cre14	N_A	8	6	6	8	6	9	9	13
	H_O	0.31	0.67	0.36	0.43	0.86	0.87	0.71	0.62
	H_E	0.86	0.82	0.83	0.84	0.82	0.85	0.78	0.87
	PIC	0.84	0.79	0.81	0.82	0.80	0.83	0.76	0.85
	P_{H-w}	0.00	0.42	0.00	0.00	0.72	0.12	0.08	0.00
Cre107	N_A	5	6	7	8	5	6	7	9
	H_O	0.86	1.00	1.00	0.87	0.64	0.93	0.79	0.87
	H_E	0.77	0.78	0.84	0.80	0.69	0.71	0.77	0.84
	PIC	0.73	0.75	0.82	0.78	0.65	0.68	0.74	0.82
	P_{H-w}	0.23	0.06	0.32	0.10	0.58	0.68	0.69	0.21
Cre22	N_A	5	5	5	6	10	6	5	14
	H_O	0.54	0.21	0.77	0.67	0.64	0.57	0.64	0.58
	H_E	0.68	0.56	0.64	0.73	0.82	0.74	0.69	0.78
	PIC	0.62	0.51	0.59	0.68	0.80	0.70	0.64	0.74
	P_{H-w}	0.53	0.00	0.94	0.17	0.00	0.04	0.79	0.00
Cre46	N_A	4	5	5	5	5	5	6	9
	H_O	0.57	0.27	0.46	0.60	0.36	0.27	0.53	0.44
	H_E	0.47	0.40	0.67	0.52	0.65	0.47	0.65	0.62
	PIC	0.41	0.38	0.63	0.49	0.58	0.42	0.62	0.58
	P_{H-w}	0.31	0.10	0.00	1.00	0.02	0.03	0.17	0.00

· 续表 1 ·

位点 loci		湖南益阳	湖南汉寿	湖北荆州	江苏苏州	上海	浙江海宁	江西弋阳	所有群体 all stocks
		HNY Y (n=14)	HNHS (n=15)	HBJZ (n=13)	JSSZ (n=15)	SH (n=15)	ZJHN (n=15)	JXYY (n=15)	
Cre37	N_A	11	11	11	12	15	9	12	23
	H_O	0.86	0.67	0.91	0.73	0.73	0.64	0.64	0.77
	H_E	0.88	0.87	0.89	0.89	0.92	0.85	0.89	0.92
	PIC	0.87	0.86	0.88	0.88	0.92	0.83	0.87	0.91
	P_{H-w}	0.76	0.02	0.36	0.06	0.01	0.13	0.13	0.00
Cre45	N_A	10	7	8	9	10	8	11	25
	H_O	0.92	0.77	0.92	0.93	0.86	0.79	0.80	0.85
	H_E	0.86	0.78	0.80	0.85	0.88	0.86	0.84	0.93
	PIC	0.84	0.74	0.77	0.84	0.86	0.84	0.82	0.92
	P_{H-w}	0.89	0.03	0.78	0.95	0.04	0.08	0.23	0.07
平均值 mean	N_A	6.75	6.13	7.38	8.75	8.13	7.00	7.75	7.41
	H_O	0.63	0.58	0.69	0.67	0.69	0.64	0.69	0.66
	H_E	0.73	0.67	0.72	0.77	0.78	0.74	0.76	0.74
	PIC	0.69	0.64	0.70	0.75	0.75	0.71	0.73	0.71

表 2 7 个乌龟群体的特有等位基因分布

Tab. 2 Number of private alleles at eight microsatellite loci in seven *C. reevesii* stocks

群体 stocks	位点 loci								总计 total
	Cre9	Cre48	Cre14	Cre107	Cre22	Cre46	Cre37	Cre45	
HNY Y	1						1	2	4
HNHS					1				1
HBJZ		1					1	1	3
JSSZ		9					1	1	11
SH	2				5	1	6		14
ZJHN	1		2			1	1	1	6
JXYY	1		1			1		2	5

2.2 遗传分化和遗传结构

7 个群体的 F 统计量分别为 $0.1571 (F_{IT})$, $0.1042 (F_{IS})$, $0.0591 (F_{ST})$ 。两两群体间的 F_{ST} 值在 0.0143 和 0.1127 之间,全部小于 0.15 (表 3);且明显的分成两部分,其中小于 0.05 的为 12 组,介于 0.05 和 0.15 之间的为 9 组;即 57.14% 的两两群体间无分化,而 42.86% 的两两群体间出现中等程度分化。另外从基因流分布情况来看,两两群体间的 N_m 值都大于 1,范围在 1.9685 和 17.1838 之间(表 3)。

分子变异方差分析 (AMOVA) 发现,仅有 5.91% ($P < 0.05$) 的遗传变异来自于群体间,其余 84.29% ($P < 0.05$) 的变异均来自于群体内部,这表明了遗传变异主要存在于个体间,个体间遗

传变异大于群体间的遗传变异(表 4)。

聚类先后顺序可以反映群体间亲缘关系的远近。从表 5 中看到,湖南益阳 (HNY Y) 和湖南汉寿 (HNHS) 群体间的遗传距离最近 (0.1066),遗传相似性系数最大 (0.8989),亲缘关系最近;湖北荆州 (HBJZ) 和江西弋阳 (JXYY) 群体间的遗传距离最远 (0.6468),遗传相似性系数最小 (0.5237),亲缘关系最远。另外从 UPGMA 聚类图中可以看出,7 个养殖群体聚为两个明显的分支:湖北荆州 (HBJZ) 群体自聚为一支;湖南益阳 (HNY Y),湖南汉寿 (HNHS),江苏苏州 (JSSZ),上海 (SH),浙江海宁 (ZJHN) 和江西弋阳 (JXYY) 6 个群体聚为另一支(图 2)。

表 3 7 个乌龟群体两两间的 F_{ST} 和 N_m 值 (下三角为 F_{ST} , 上三角为 N_m)Tab. 3 Pair-wise F_{ST} below the diagonal and the number of migrants per generation (N_m) above the diagonal between the seven *C. reevesii* stocks estimated from the eight microsatellite loci

	HNY Y	HNHS	HBJZ	JSSZ	SH	ZJHN	JXYY
HNY Y		13.314 8	4.338 0	12.956 6	6.802 2	9.682 5	4.869 8
HNHS	0.018 4		2.958 8	5.180 1	2.466 8	3.103 0	2.457 4
HBJZ	0.054 5	0.077 9		4.961 6	3.126 1	2.655 6	1.968 5
JSSZ	0.018 9	0.046 0	0.048 0		6.047 2	11.202 1	4.766 1
SH	0.035 5	0.092 0	0.074 1	0.039 7		17.183 8	4.014 0
ZJHN	0.025 2	0.074 6	0.086 0	0.021 8	0.014 3		9.137 9
JXYY	0.048 8	0.092 3	0.112 7	0.049 8	0.058 6	0.026 6	

表 4 7 个乌龟群体的分子变异方差分析

Tab. 4 Analysis of molecular variances (AMOVA) of microsatellites in seven *C. reevesii* stocks

变异 source of variation	自由度 df	总方差 sum of squares	变异组分 variance components	占总变异的百分比 percentage of variation	固定系数 fixation indices
群体间 among stocks	6	36.297	0.12947 V_a	5.91 *	0.059 1
群体内个体间 among individuals within stocks	95	216.394	0.214 90 V_b	9.80 *	0.104 2
所有个体间 within individuals	102	188.500	1.848 04 V_c	84.29 *	0.157 1
total	203	441.191	2.192 41		

注: * 差异显著 ($P < 0.05$)。Notes: * means significant difference ($P < 0.05$).

表 5 7 个乌龟群体间的遗传距离 (下三角) 和遗传相似性系数 (上三角)

Tab. 5 Genetic similarity coefficient and genetic distance of the seven *C. reevesii* stocks

Pop ID	HNY Y	HNHS	HBJZ	JSSZ	SH	ZJHN	JXYY
HNY Y		0.898 9	0.758 2	0.859 3	0.798 5	0.850 8	0.762 6
HNHS	0.106 6		0.736 2	0.818 4	0.662 1	0.742 5	0.675 8
HBJZ	0.276 9	0.306 3		0.757 5	0.653 0	0.649 3	0.523 7
JSSZ	0.151 6	0.200 4	0.277 7		0.751 8	0.849 3	0.728 0
SH	0.225 0	0.412 3	0.426 2	0.285 3		0.874 2	0.683 5
ZJHN	0.161 5	0.297 7	0.431 8	0.163 4	0.134 4		0.839 2
JXYY	0.271 0	0.391 9	0.646 8	0.317 4	0.380 5	0.175 3	

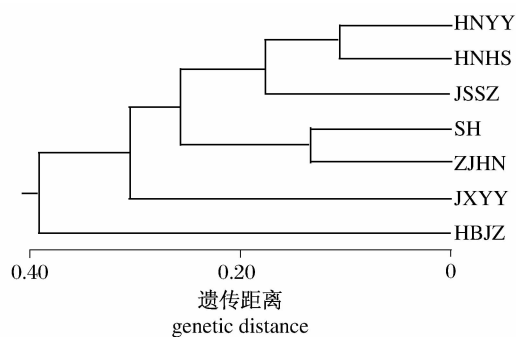


图 2 根据 Nei 氏遗传距离构建的 UPGMA 树
Fig. 2 UPGMA dendrogram based on the genetic distance computed by Nei's between *C. reevesii* stocks, according to microsatellite DNA analysis

3 讨论

3.1 乌龟养殖群体的遗传多样性

本研究首次通过微卫星标记对乌龟养殖群体进行遗传分析。在 7 个群体中共检测到 130 个等位基因, 每个位点的等位基因数目为 9 ~ 26 个, 平均为 16.25。通过与其他龟鳖类相比较发现, 乌龟拥有较高的等位基因数目。如 Ciofi 等^[21] 利用 10 个微卫星位点研究了象龟 (*Geochelone nigra*) 种群间的遗传分化, 得出各种群在各个微卫星位点上表现出不同的等位基因数目, 最少的为 12 个, 最多为 37 个, 平均为 21.1 个。Hauswaldt 等^[22] 筛选的 5 个菱斑龟 (*Malaclemys terrapin*) 微

卫星位点,等位基因数目范围在 8~14,平均值为 10.67。Aggarwal 等^[23]筛选榄蠵龟(*Lepidochelys olivacea*)的 6 个微卫星标记,等位基因范围在 1~24,平均值为 13.17。Fantin 等^[24]筛选了黄斑侧颈龟(*Podocnemis unifilis*)的 17 个微卫星位点,等位基因范围在 3~11,平均值为 7.13。乌龟的平均等位基因数目比象龟低,但是比菱斑龟,榄蠵龟,黄斑侧颈龟高。总的来看,这几个龟鳖种类都存在较高的等位基因数目,多态性丰富,这也符合龟类动物的遗传变异水平较高的观点。因为高水平的遗传变异有助于龟类动物的生存与延续,而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^[8]。Surridge 等^[25]指出,微卫星标记是由微卫星的核心序列与其两侧的侧翼序列组成,侧翼序列使微卫星位点具有特异性,而微卫星本身重复单位数的变异使其具有多态性。一般情况下,微卫星标记核心序列重复次数越多,其变异就越大,该位点的等位基因数也就越多,重复次数与多态性存在正相关。但是从该研究的结果来看,核心序列的重复次数与等位基因数目并没有表现出明显的相关性。

该研究的乌龟群体其平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.66 和 0.74,表明所研究的乌龟群体存在较大的遗传变异。这与朱新平等^[10]利用 RAPD 分析乌龟遗传多样性所得到的结论一致,即乌龟群体内的遗传差异较大。

多态信息含量(PIC)是衡量基因变异程度高低的指标,当 $PIC > 0.5$ 时,该基因座位为高度多态性; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态; $PIC < 0.25$ 时为低度多态性^[26]。该研究中 8 个微卫星标记的多态信息含量范围在 0.57 和 0.92 之间,平均为 0.71,均为高度多态,表明本研究所选择的位点可作为有效的遗传标记用于乌龟群体的遗传多样性和遗传结构分析。

3.2 乌龟养殖群体间的遗传分化

群体间遗传分化指数 F_{ST} 是衡量群体间遗传差异的主要指标^[12]。Wright^[27]将 F_{ST} 分为 4 个范围:群体遗传分化较弱($F_{ST} < 0.05$);群体遗传分化中等($0.05 < F_{ST} < 0.15$);群体遗传分化较大($0.15 < F_{ST} < 0.25$);群体遗传分化显著($F_{ST} > 0.25$)。本研究得出乌龟两两群体间的 F_{ST} 值在

0.014 3 和 0.112 7 之间,其中 57.14% 的群体间无分化,而 42.86% 的群体间出现中等程度分化。比较 7 个乌龟群体的基因流(N_m)发现,两两群体间的 N_m 值都大于 1,说明在短期人工养殖隔离下,遗传漂变($N_m < 1$,遗传漂变为种群遗传结构变化主要因素)未成为群体遗传结构变化的主要因素。

UPGMA 聚类分析表明,湖北荆州群体自聚为一支,其余 6 群体聚为另一支,其中湖南益阳(HNY)和湖南汉寿(HNHS)群体最先聚到一起,其次上海(SH)和浙江海宁(ZJHN)群体聚到一起。在地理分布上湖北荆州(HBJZ)群体位于长江以北,其余 6 群体均位于长江以南(图 1),且湖南益阳(HNY)与湖南汉寿(HNHS)群体间的地理距离最近,因此该聚类图与养殖群体间地理距离分布的远近有着明显的相关性。针对这一结果,可以推测(1)长江作为天然屏障,一定程度上阻隔了乌龟群体间的基因交流;(2)乌龟的活动范围小、能力弱,各群体间的基因交流不多,因此除人为的因素有小部分个体在来源上有混杂外,其余的个体基本上是来源于当地的野生种后代;(3)各养殖场选育目标和要求的差异也对聚类的结果产生一定的影响。

乌龟群体分化系数(F_{ST})的总值为 0.059 1,处于中度分化范围(F_{ST} 介于 0.05~0.15),但是更接近于无分化的界限($F_{ST} < 0.05$),可以推知乌龟养殖群体间遗传分化不明显。AMOVA 分析得出大部分的遗传变异来自于群体内(84.29%),仅有 5.91% 的变异是存在于群体之间,这也同样证实了乌龟群体间的遗传分化水平较低。乌龟群体间存在的这种低水平遗传分化,不仅与现有群体内的高度遗传多样性有关,可能也与养殖隔离时间较短有关系。

在 7 个乌龟群体中发现 44 个特有等位基因,且每个群体都至少在某一个位点上有一个特有等位基因,其中上海(SH)群体拥有的特有等位基因数最多,达到 14 个;湖南汉寿(HNHS)群体最少,仅有 1 个。这些特有等位基因的存在引起了乌龟群体高水平的遗传多样性,同时对乌龟的遗传结构产生了一定影响。

3.3 哈迪-温伯格平衡

当种群处于哈迪-温伯格平衡时,各等位基因在群体中的分布频率应该是相对稳定,观测杂

合度和期望杂合度之间没有显著的差异。本研究结果表明,将各群体合并为一个集合种群来看,有5个位点显著或极显著的偏离了哈迪-温伯格平衡。在种群遗传学研究中,经常会碰到不符合哈迪-温伯格平衡的现象,主要原因是华伦德效应(Wahlund effects),近亲交配(inbreeding)、无效等位基因(null alleles)等导致的杂合度不足^[28]。AMOVA分析结果表明,5.91%的遗传变异源于群体间差异,说明群体间遗传分化程度微弱,排除了因为华伦德效应而引起的哈迪-温伯格不平衡。位点Cre9和Cre14中,发现了无效等位基因的存在,但无效等位基因频率很低,不足以引起群体偏离哈迪-温伯格平衡。所以偏离哈迪-温伯格平衡的最有力的解释是群体内部出现了近交繁殖的现象。关于近交繁殖现象的出现,可以从另外方面来佐证。本研究计算得到乌龟群体间的 F_{IS} 值为0.1571,说明群体内纯合子较多;通过表1也可以看到,大部分位点的期望杂合度(H_E)大于观测杂合度(H_O),这符合近亲交配的结果($F_{IS} > 0, H_E > H_O$)。虽然乌龟人工养殖开展的时间并不长,但近交繁殖的现象已经出现,因而在养殖过程中应充分利用群体的遗传特性,开展有计划的选育和杂交实验,以维持养殖群体的遗传多样性。

实验操作和数据分析过程中得到南京师范大学李树珍和浙江师范大学孙波的帮助,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 陈壁辉. 安徽两爬动物志[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1991:180-183.
- [2] 杨文鸽,徐大伦,李花霞,等. 乌龟肌肉营养价值的评定[J]. 水产科学,2004,23(3):33-35.
- [3] 周婷. 我国龟类养殖业现状[J]. 大自然,2003(5):10-11.
- [4] 陶勇,李进华,武廷章,等. 乌龟尿液主要成分测定及其抑菌效果研究[J]. 生物学杂志,2005,22(6):41-42.
- [5] 谭立军,刘筠,陈淑群. 乌龟胚胎发育的研究[J]. 水生生物学报,2001,25(6):605-612.
- [6] 杜卫国,郑荣泉. 不同孵化湿度下的乌龟卵孵化成功率及新生幼体特征[J]. 动物学报,2004,50(1):133-136.
- [7] Du W G, Zheng R Q, Shu L. The influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance and cold tolerance of hatchling Chinese three-keeled pond turtle, *Chinemys reevesii* [J]. Chel Conserv Biol, 2006, 5(2): 294-299.
- [8] 侯陵. 孵化温度与乌龟的性别[J]. 两栖爬行动物学报, 1985, 4(2): 130-133.
- [9] 张海军, 聂刘旺, 单祥年, 等. 乌龟 Sox 基因的克隆及测序[J]. 动物学研究, 2001, 22(4): 336-339.
- [10] 朱新平, 杜合军, 周莉, 等. 乌龟遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 167-171.
- [11] 胡雪松, 李池陶, 马波, 等. 3 个德国镜鲤养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 575-582.
- [12] 傅洪拓, 乔慧, 李法君, 等. 长江不同江段青虾的遗传多样性[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 204-212.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. Cold Spring: Harbour Laboratory Press, 1989.
- [14] Ye R H, Zheng R Q, Wang L. Polymorphic microsatellite loci in the Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*) [J]. Conserv Genet, 2009, 10(4): 1045-1048.
- [15] Raymond M, Rousset F. Genepop (version 3.4): population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. J Hered, 1995, 86(3): 248-249.
- [16] Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, et al. Genetix, A windows™ based software for population genetic analyses [OL]. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRSUMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 2000.
- [17] Park S D E. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection [D]. Dublin: University of Dublin, 2001.
- [18] Excoffier L, Laval L G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evol Bioinform Online, 2005, 1(1): 47-50.
- [19] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.32. Microsoft window-base software for population genetic analysis; a quick user's guide [OL]. A joint Project development by the authors, University of Alberta, Center for International Forestry Research, Alberta, Canada, 1999.
- [20] Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5c [R]. A technical report, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA, 1993.
- [21] Ciofi C, Milinkovitch M C, Gibbs J P, et al.

- Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of *Geochelone nigra* [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(11):2265–2283.
- [22] Hauswaldt J S, Travis C G. Microsatellite DNA loci from the Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(2): 174–176.
- [23] Aggarwal R K, Velavan T P, Udaykumar D, *et al.* Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(1):77–79.
- [24] Fantin C, Carvalho C F, Hrbek T, *et al.* Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered *Podocnemis unifilis* Amazon River turtle [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(6):1235–1238.
- [25] Surridge A K, Bell D J, Ibrahim K M, *et al.* Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia [J]. *Heredity*, 1999, 82(5):479–487.
- [26] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Anim Genet*, 1980, 32(3):314–331.
- [27] Wright S. Evolution and the genetics of population, Vol 4. Variability within and among natural populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [28] Lade J A, Murray N D, Marks C A, *et al.* Microsatellite differentiation between Philip Island and mainland Australian populations of the red fox (*Vulpes vulpes*) [J]. *Mol Ecol*, 1996, 5(1):81–87.

Microsatellite DNA analysis of genetic diversity among captive breeding stocks of Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*)

ZHANG Yun¹, YU Dan-na¹, DU Wei-guo², ZHENG Rong-quan^{1*}, YANG Guang³

(1. Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

2. College of Biology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China;

3. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii* Gray, 1831) is one of the main turtle species in China with commercial and medicinal importance, and it began to attract attention as a breeding species in 1990s and became one of the largest domestic breeding varieties. The population of farmed Chinese pond turtle increased in China, however, only little is known on the genetic status of this species. In this study, eight highly variable microsatellite loci were used to investigate genetic diversity and captive stocks structure of Chinese pond turtle in China. A total of 130 different alleles were detected in all examined loci. The number of alleles ranged from 9 to 26, with an average number of 16.25 per locus. The high number of alleles per locus within these stocks indicated the potential usefulness of these primers to characterize stock genetic structure of *C. reevesii*. The results demonstrated that seven stocks showed high polymorphic information content (*PIC*) values (ranged between 0.57 and 0.92), which is much higher than the standard value of 0.5, and the observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.30 to 0.87 and from 0.60 to 0.93, respectively. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that almost majority of the variance in the *C. reevesii* was within stocks (84.29%), and 5.91% was among stocks. All pairwise F_{ST} estimates between the seven stocks ranged from 0.0143 to 0.1127 and were also significantly different from zero ($P < 0.05$), which showed that a low genetic divergence was between stocks. Hardy-Weinberg equilibrium analysis indicated that there were five loci in great significant Hardy-Weinberg disequilibrium, and each locus in each stock test showed that there were 19.64% (11/56) loci in significant genetic disequilibrium ($P < 0.05$), 14.29% (8/56) loci were at a very significant level ($P < 0.01$), and the rest of the 66.07% (37/56) loci were in genetic equilibrium ($P > 0.05$). The most plausible explanation for heterozygote deficiency is inbreeding in this cultured stocks. Examination of linkage disequilibrium using Fisher's exact test revealed that all eight loci were in linkage equilibrium ($P > 0.05$ for each pair of loci across all samples). The genetic distance and genetic similarity coefficient among stocks ranged from 0.1066 to 0.6468 and from 0.5237 to 0.8989, respectively. The dendrogram based on genetic distance showed two major clusters: the stock from Jingzhou, Hubei province (HBJZ) alone was in one cluster, which is sampled from the north of Yangtze River. The other cluster consists of individuals from sampling localities distributed in the south of Yangtze River. The isolation within *C. reevesii* may be attributed to Yangtze River, which acted as a barrier to block gene flow. Forty-four private alleles occurred within the seven *C. reevesii* stocks and only one in the HNHS stock, which compares with 14 private alleles in the SH stock. The discovery of unique alleles within the stocks supported the conclusion that these stocks had differentiated from each other and that gene flow had been restricted among stocks gradually. Thus, it may be possible to form a new superior broodstock with high genetic diversity by combining turtles from different stocks, and measures should be taken to prevent further loss of genetic diversity.

Key words: Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*); genetic diversity; microsatellite

Corresponding author: ZHENG Rong-quan. E-mail: zhengrq@zjnu.cn