

## 中华鳖3个地理群体线粒体基因D-loop区遗传多样性分析

黄雪贞<sup>1,2</sup>, 钱国英<sup>2\*</sup>, 李彩燕<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

**摘要:** 采用PCR结合DNA测序技术和SSCP技术,分析了中华鳖3个地理群体线粒体DNA(mtDNA)D-loop区部分序列的变异及遗传多样性。在25个个体中,其碱基组成为A+T的平均含量(65.4%)高于G+C(34.6%),共检测到变异位点7个(约占总位点数的5.7%),转换/颠换值为2.76。核苷酸多样性( $\pi$ )为0.01995,平均核苷酸差异数( $K$ )为2.453。25个个体分属6个单倍型,单倍型多样性( $H_d$ )为0.707,单倍型间的平均遗传距离( $P$ )为0.027。6个单倍型构建的UPGMA系统树聚为3个分支。结果表明,中华鳖群体mtDNA D-loop区序列存在着较丰富的变异和遗传多样性,日本鳖的遗传多样性比黄河鳖和黄沙鳖丰富,黄沙鳖与日本鳖、黄河鳖的遗传距离较远。而且PCR-SSCP可以检测到两种类型的电泳图谱,其中II型均为日本鳖,该技术可用于78位TT $\longleftrightarrow$ AA颠换变异位点的检测。

**关键词:** 中华鳖; 线粒体DNA; D-loop区; 遗传多样性; PCR-SSCP

**中图分类号:** Q347; S917

**文献标志码:** A

中华鳖(*Trionyx sinensis*)是我国重要的特种水产经济养殖动物之一,除西藏、青海及新疆外,其他地区均有分布,多见于长江流域和华南地区,国外主要分布于朝鲜、日本和越南<sup>[1]</sup>。目前,我国一些省市已相继建立了中华鳖原种、良种场<sup>[2]</sup>,启动了中华鳖种质资源的保护以及良种选育工作,但由于长达二十多年来的苗种盲目引进以及管理不善,致使中华鳖种质存在一定程度上的混杂。为保证中华鳖养殖业的长远发展,对各地区的中华鳖种群遗传多样性进行检测评价,颇具意义。

线粒体DNA具有较快的进化速度,母系遗传,基因组内几乎不含内含子等优势,常被用于分析群体的遗传多样性、种属的进化系统发育特点等<sup>[3-6]</sup>。在线粒体DNA中,由于生物种类所受的选择压力不同,各基因的进化速度都是不同的。一般认为,Cytb基因、Cytc基因、16S rRNA基因和12S rRNA基因相对比较保守,适宜研究“种”以上的系统进化关系,而“种”以下

则需要选择进化快的区域,以D-loop区的应用较常见,有时也用Cytb基因<sup>[7-8]</sup>。目前,关于中华鳖线粒体DNA的遗传多样性研究,主要集中在Cytb基因<sup>[9-12]</sup>、12S rRNA基因<sup>[13-14]</sup>与16S rRNA基因<sup>[14]</sup>。如李思发等<sup>[9]</sup>利用RFLP技术对我国华东地区3个群体线粒体DNA(mtDNA)的细胞色素b基因进行分析,得出3群体的遗传关系与地理距离相一致,暗示地理分隔可能是造成中华鳖群体遗传分化的主要原因,同时还发现内切酶He III和Hha I可作为中华鳖种群鉴定的标志酶;张海琪等<sup>[10]</sup>对中华鳖太湖养殖种群和日本引进种群的线粒体DNA细胞色素b基因中间部分序列进行测定分析,认为两种种群序列上的差异,可以成为种群鉴别的分子标记;张永正等<sup>[11]</sup>利用线粒体细胞色素b基因序列对中华鳖5个不同地理种群(太湖群体、日本群体、江西群体、台湾群体和乌鳖群体)的遗传结构进行分析,认为其序列上的差异,可以成为种群鉴别的分子标记,发现在聚类分析

收稿日期:2011-04-17 修回日期:2011-11-07

资助项目:浙江省农业科技重大攻关项目(2006C12011)

通讯作者:钱国英,E-mail:qiangy@zww.edu.cn

中同一个地理区域的群体并未聚成一类,未按照地理位置形成明显的地理格局;陈合格等<sup>[12]</sup>从三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因核苷酸序列的显著差异和酶切位点的变化,证明了砂鳖是不同于中华鳖属的一新种。目前养殖中华鳖大多是同种的地理种群,而对于应用线粒体 DNA 控制区(D-loop区)分析中华鳖不同地理群体的遗传多样性尚未见报道。本研究选择进化较快的 D-loop 区,结合测序结果和 PCR-SSCP(单核苷酸多态性)技术来分析中华鳖不同地理群体的遗传结构,旨在为中华鳖群体的种质资源保护提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验材料采自浙江绍兴中华鳖原种场,体质量 600~800 g,日本鳖 6 只(2005 年从杭州引进,记为 R,编号 9~14),黄河鳖 13 只(2003 年先后从山东省寿光县引进,记为 H,编号 9~21),黄沙鳖 6 只(2007 年从广西桂平市引进,记为 S,编号 1~6)。

### 1.2 实验仪器与试剂

*Taq* DNA 聚合酶与 DL2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;通用基因组小量抽提试剂盒、丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺、过硫酸胺、Tris 等购自生工生物工程(上海)有限公司;TEMED 由华美生物工程有限公司提供;无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{AgNO}_3$ 、EDTA 等为一般 AR 试剂。

PCR 仪型号为 Eppendorf 公司的 ProS 型号、垂直电泳仪为 Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell。

### 1.3 DNA 的提取

中华鳖常规解剖,取肌肉组织提取 DNA,剩余组织于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。实验采用通用基因组小量抽提试剂盒提取法提取中华鳖基因组 DNA,具体方法参见王忠华等<sup>[15]</sup>。DNA 提取后用 1.0% 的琼脂糖进行纯度检测后保存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  备用。

### 1.4 线粒体 DNA D-loop 的扩增及序列测定

根据 NCBI 基因库上提交的中华鳖线粒体基因组序列(A Y962573)设计一对扩增 D-loop 区部分序列的特异引物,预期扩增大小为 168 bp。上下游引物序列分别为 F6: 5'-

TGGCATCTGGTTGCTTTTTCAGGCA-3'; R6: 5'-TGGGGGCCTGAGACCACAGA-3',由生工生物工程(上海)有限公司进行合成。

PCR 反应体系总体积为 25  $\mu\text{L}$ ,其中:10  $\times$  PCR Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), *Taq* DNA 聚合酶 0.125  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ),模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ ,后以灭菌双蒸水补齐。PCR 扩增循环程序为 95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min,接着 94  $^\circ\text{C}$  55 s,57.5  $^\circ\text{C}$  60 s,72  $^\circ\text{C}$  60 s,35 个循环后,72  $^\circ\text{C}$  60 min。扩增后取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行电泳分离,电泳缓冲液为 1  $\times$  TBE 缓冲液。EB 染色后用凝胶成像分析仪拍照,记录结果。将 PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司进行测序反应,为保证序列的准确性,序列进行双向测序。

### 1.5 SSCP 凝胶电泳与银染

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶[浓度 12% (29:1)]进行检测。取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物,加入 10  $\mu\text{L}$  上样缓冲液(98% 甲酰胺,0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 2 mL,0.25% 二甲苯菁,0.25% 溴酚蓝,2% 甘油)95  $^\circ\text{C}$  变性 10 min,取出后立即冰浴 5 min 后上样,130 V 电压电泳 1.5~2.0 h(预电泳 30 min),硝酸银染色,拍照。

### 1.6 序列分析

测得序列用 ClustalX 程序进行比对,并辅以人工校对。利用 DNAsp 4.0 软件统计单倍型及变异位点、计算单倍型多样性( $H_d$ )及核苷酸多样性( $\pi$ ),评价群体遗传多样性水平。采用 MEGA 4.1 软件计算群体间和群体内 Kimura 2-parameter 模型的遗传距离以及分析碱基组成及核苷酸位点的替换数。

## 2 结果

### 2.1 D-loop 区 PCR-SSCP 结果

利用本实验设计的引物所扩出来的中华鳖群体 mtDNA D-loop 区的片段大小约为 170 bp(图 1),电泳图中未发现非特异性条带,且空白对照组未出现扩增产物,可以排除外源 DNA 污染。对该片段进行非变性聚丙烯酰胺电泳分析后发现,该序列存在单核苷酸多态性(图 2),本实验可以检测到两种类型的电泳图谱,分别定义为 I 型和 II 型,其中 II 型均为日本鳖。

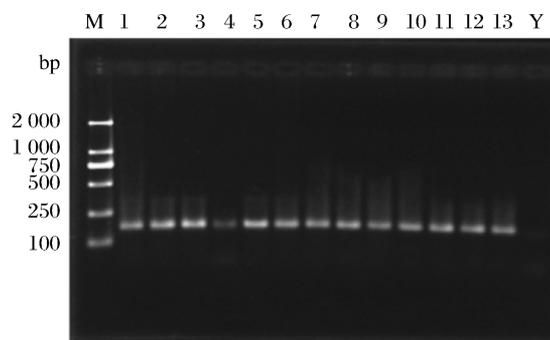


图 1 中华鳖 mtDNA D-loop 区部分序列扩增产物电泳图

M:DL2000 DNA 分子量标准; 1 ~ 13: 部分样品; Y: 阴性对照。

Fig. 1 PCR result of mtDNA D-loop partial sequences in *T. sinensis*

M:DL2000 DNA marker; 1 - 13: The partial samples; Y: Negative control.

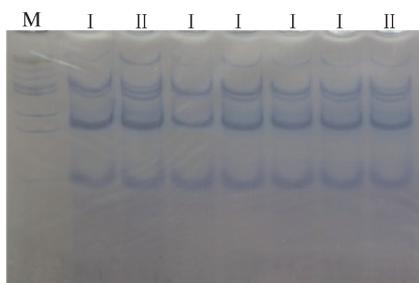


图 2 中华鳖 mtDNA D-loop 区部分序列扩增产物的 SSCP 电泳图

M:分子量标准; I、II:聚丙烯酰胺凝胶检测到的两种类型电泳图谱。

Fig. 2 The SSCP result for PCR product of mtDNA D-loop partial sequences in *T. sinensis*

M:Marker; I, II: The two types tested by PAGE.

## 2.2 序列分析

测序结果显示,本实验扩增的中华鳖 3 个群体的 D-loop 区的片段大小为 170 ~ 177 bp,与预计的扩增产物大小 168 bp 相差不大。为保证测得序列的准确性,在 GenBank 上进行 Blast 分析,结果显示与提交的中华鳖线粒体 DNA 序列 (AY687385. 1、AY962573. 1、GU568175. 1) 部分片段的同源性可以达到 95% 以上。通过比对和人工校对及去掉两端的引物序列,用于进一步分析的片段大小除 S1、S4、S6 为 124 bp 外,其余均为 123 bp,此差异主要是由碱基的插入及缺失引起的。经软件分析,测序的片段同源性达到 97.9%,变异位点 7 个,约占总位点数的 5.7%,均为简约信息位点,位置为 22、26、78、113、121、122、123;没有发现单一多态位点。3 个群体 A 碱基含量的平均值为 24.8%,T 为 40.6%,C 为 20.0%,G 的含量为最低,仅为 14.6%,A + T 的平均含量(65.4%)显著高于 G + C(34.6%)。转换与颠换的比 (si/sv) 为 2.76。

25 个个体分属于 6 种单倍型(表 1),以单倍型 3(Hap\_3) 包含的个体数最多,为 13 个,其次为单倍型 2(Hap\_2)、单倍型 5(Hap\_5)、单倍型 6(Hap\_6) 均为 3 个,再次为单倍型 1(Hap\_1) 有 2 个,单倍型 4(Hap\_4) 具有的个体数最少只有 1 个。从表中也可发现,黄沙鳖(S) 群体分属于单倍型 5 和 6,黄河鳖(H) 群体分属于单倍型 2、3 和 4,日本鳖(R) 群体分属于单倍型 1、2 和 3。单倍型 2 和 3 为黄河鳖与日本鳖共享的单倍型,黄沙鳖与黄河鳖、日本鳖没有共享的单倍型。

表 1 中华鳖 mtDNA D-loop 部分序列的变异位点及单倍型

Tab. 1 Variable loci and haplotypes of mtDNA D-loop partial sequences in *T. sinensis*

单倍型 haplotype	变异位点 variable locus							群体号 population number
	2	2	7	1	2	2	2	
Hap_1	A	T	T	T	C	T	C	R9,R14( II )
Hap_2	T	C	A	C	T	.	.	R10,R13,H10( I )
Hap_3	.	.	A	.	.	.	.	R11,R12,H9,H11,H12,H14,H15,H16,H17,H18, H19,H20,H21( I )
Hap_4	T	C	A	.	.	.	.	H13( I )
Hap_5	T	C	A	C	T	C	T	S1,S4,S6( I )
Hap_6	T	C	A	C	.	.	.	S2,S3,S5( I )

注:圆点(·)表示与 Hap1 相同的碱基,( I )( II )表示聚丙烯酰胺凝胶检测到的类型。

Notes:Dot(·) means the same bases in Hap2—Hap6 as in Hap1,( I )( II ) mean the types tested by PAGE.

### 2.3 mtDNA D-loop 序列的遗传多样性及分子系统树

利用 DNAsp 软件计算了中华鳖 25 个个体 mtDNA D-loop 序列的遗传多样性指数(表 2),单倍型多样性( $H_d$ )为 0.707,核苷酸多样性( $\pi$ )为 0.019 95,平均核苷酸差异数( $K$ )为 2.453。

表 2 中华鳖 mtDNA D-loop 部分序列的遗传多样性指数

Tab. 2 Genetic diversity indices of mtDNA D-loop partial sequences in *T. sinensis*

遗传多样性指数 genetic diversity indices	数值 value
多态性位点数 number of polymorphic sites, $S$	7
单倍型数 number of haplotypes, $H$	6
单倍型多样性 haplotype diversity, $H_d$	0.707
核苷酸多样性 nucleotide diversity, $\pi$	0.019 95
平均核苷酸差异数 average number of nucleotide differences, $K$	2.453

应用 MEGA 软件,根据 D-loop 序列计算了 6 个单倍型之间的遗传距离(表 3),单倍型的平均遗传距离为 0.027(标准误为 0.010)。从表 3 可看出,单倍型 1 与单倍型 3、单倍型 2 与单倍型 6、单倍型 4 与单倍型 6 的遗传距离最小,均为 0.008;单倍型 1 与单倍型 5 的遗传距离最大,为 0.060。通过软件构建了中华鳖不同群体单倍型间的 UPGMA 分子系统树(图 3),6 种单倍型聚为 3 个分支,Bootstrap 检验重复为 1 000 次。其中单倍型 1 和 3 聚为一大支,单倍型 5 为独立一大支,单倍型 4 和 6 先聚为一支,再与单倍型 2 聚为一大支。

表 3 中华鳖 mtDNA D-loop 部分序列单倍型间的遗传距离

Tab. 3 The genetic distance between haplotypes of mtDNA D-loop partial sequences in *T. sinensis*

	Hap_1	Hap_2	Hap_3	Hap_4	Hap_5	Hap_6
Hap_1		0.018	0.008	0.014	0.023	0.017
Hap_2	0.042		0.016	0.011	0.012	0.008
Hap_3	0.008	0.033		0.012	0.021	0.014
Hap_4	0.025	0.017	0.016		0.017	0.008
Hap_5	0.060	0.017	0.051	0.034		0.015
Hap_6	0.033	0.008	0.025	0.008	0.025	

注:下三角为遗传距离,上三角为标准误。

Notes: Below diagonal is distance, above diagonal is SE.

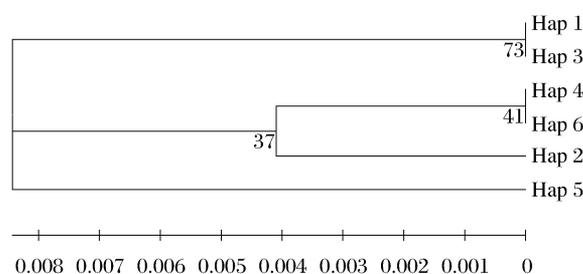


图 3 中华鳖群体 mtDNA D-loop 部分序列单倍型的 UPGMA 分子系统树

Fig. 3 The UPGMA phylogenetic tree of mtDNA D-loop haplotypes in *T. sinensis* population

### 2.4 3 个群体的遗传结构

3 个群体的遗传参数统计表明(表 4),H 群体的单倍型多样性明显低于 R 和 S 群体,从衡量种群遗传水平的  $K$  值和  $P_i$  值来看,H 群体明显低于 R 和 S 群体,由此可得出 H 群体的遗传水平较低。用 Kimura 2-parameter 模型计算种群内及种群间的遗传距离(表 5),3 个群体的平均遗传距离为 0.021(标准误 SE 为 0.008),S 群体与 R 和 H 群体的遗传距离较远,R 群体和 H 群体的遗传距离较近。种群间的遗传距离反映了群体间亲缘关系的远近,由此可知,S 群体与 R 和 H 群体的亲缘关系较远。衡量各群体间的遗传分化指标见表 6。

表 4 中华鳖 3 个群体的统计参数

Tab. 4 Demographic parameters estimated from three populations of *T. sinensis*

种群 population	$H$	$H_d$	$K$	$\pi$
R	3	0.800 00	2.667	0.022 19
H	3	0.294 87	0.872	0.007 09
S	2	0.600 00	1.800	0.014 63

表 5 中华鳖 3 个群体的遗传距离

Tab. 5 Genetic distance of three populations

群体 population	R	H	S
R		0.022(0.010)	(0.007) (0.013)
H	0.015		0.007(0.004) (0.015)
S	0.032	0.035	

注:括号内为标准误。

Notes: Number in bracket means SE.

表6 中华鳖各群体间的遗传分化  
Tab.6 Genetic differentiation among different populations of *T. sinensis*

种群1 Pop1	种群2 Pop2	基因多样 度 $H_s$	平均核苷酸 差异数 $K_{xy}$	基因分化 系数 $G_{ST}$	遗传分化 指数 $F_{ST}$	核苷酸分 歧度 $D_{xy}$	核苷酸净 遗传距离 $D_a$
R	H	0.429 57	1.820 51	0.127 43	0.028 17	0.014 80	0.000 42
R	S	0.700 00	3.833 33	0.176 47	0.417 39	0.031 17	0.013 01
H	S	0.376 24	4.115 39	0.382 18	0.675 39	0.033 46	0.022 60

### 3 讨论

#### 3.1 PCR-SSCP 技术在种群遗传多样性分析上的应用特点

PCR-SSCP 分析是一种以构象为基础,用于检测基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的 DNA 单链凝胶电泳技术,其原理主要是根据形成不同构象的等长 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率变化来检测基因变异。PCR-SSCP 技术可用于检测单个碱基置换、数个碱基插入或缺失等基因变异,适用于初步检测大样本基因的变异情况。由于该技术检测灵敏、方便,易于操作,不需要大型仪器等优点,经常被用于基因点突变与疾病的检测与诊断,经济性状与功能基因的连锁关系分析,功能基因的定位<sup>[16-19]</sup>等。

本实验在中华鳖群体中共检测到两种类型的图谱,如图2所示,II型图谱比I型图谱多了一个条带。由于II型图谱主要发生在日本鳖,而黄河鳖与黄沙鳖则没有发现,提示II型为日本鳖所特有。由于本实验取材数量有限,尚需在后续的检测中做进一步的论证。从表1可以看出,II型检测到的是单倍型1,单倍型1与单倍型3序列最接近。基于本实验设计的引物目的片段为168 bp,单倍型1与单倍型3序列只在78位点出现了TT $\longleftrightarrow$ AA颠换,由此推测,这两种类型的差异可能是由于78位点的TT $\longleftrightarrow$ AA颠换,导致单核苷酸链的电泳迁移率变化。

值得注意的是,理论上,PCR-SSCP 技术可以检测任何位点上的碱基变异,但实际应用中可能会出现假阴性结果,有些突变未能被检出。本研究对3个群体的遗传多样性进行分析,得到了两种类型的电泳图谱,检测到78位的变异位点,且该类型为R群体所特有。结合测序的结果可看出,该技术并未检测到所有的变异位点。推测由于点突变引起的空间构象变化甚微,或是点突变

发生在扩增片段两端,导致迁移率相差不大,难以在PAGE电泳图谱上分开,这与植物中发生的相似<sup>[20]</sup>。因此,PCR-SSCP 技术的准确性易受点突变引起的空间构象变化的大小而影响。

#### 3.2 中华鳖线粒体 DNA D-loop 部分序列的变异性

中华鳖的线粒体 DNA 全序列已被测定,大小约为17 000 bp,GenBank 登录号为 NC\_006132 (17 364 bp)、AY962573 (17 042 bp)。其中线粒体基因组包括37个基因,即2个rRNA、22个tRNA和13个蛋白编码基因以及1个非编码控制区(D-loop区),且基因排列顺序与大多数脊椎动物相似,相邻基因间有时稍有重叠<sup>[21]</sup>。有报道指出,线粒体 DNA D-loop 的进化速率是其他区段的5倍,是一种十分有效的研究种群遗传多样性的分子标记,比较而言,更适用于研究种以下的系统进化关系<sup>[14,22]</sup>。本研究通过测序分析得出,3个群体的变异位点为7个,占分析位点的5.7%,变异程度比张海琪等<sup>[10]</sup>在中华鳖太湖养殖群体和日本引进种群的Cytb基因片段中检测到15个变异位点(约占3.7%)的结果高,这再次证明了D-loop的进化速率比线粒体DNA其它区域快。

#### 3.3 中华鳖群体的遗传多样性

遗传多样性是生物多样性的基础,遗传多样性的大小是物种长期进化的结果,往往被用于评价一个种群适应环境能力水平的高低。应用mtDNA测序技术来研究物种的遗传多样性时,通常用两个重要指标来衡量一个群体mtDNA的遗传变异程度,单倍型间的平均遗传距离( $P$ )和核苷酸多样性( $\pi$ )<sup>[23-24]</sup>。一般大多数哺乳动物的 $P$ 值都在0.01以上,就被认为变异大<sup>[25]</sup>。本实验结果显示,3个群体单倍型间的平均遗传距离为0.027,大于0.01,这说明中华鳖群体的遗传变异较大。核苷酸多样性( $\pi$ )是指给定群体内的两个随机个体mtDNA序列间平均每个位点的核苷酸差异数目。根据Nei等<sup>[23]</sup>的定义,给定群体内

两个随机选取的 mtDNA 序列间  $\pi$  值越小,表明群体的遗传多样性越低。 $\pi$  值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中比例,故在反映一个群体 mtDNA 的多态程度时比单纯的平均遗传距离更可靠。Lan 等<sup>[25]</sup>认为,当  $\pi$  值在 0.001 5~0.004 7 时,群体的遗传多样性较低。本研究中,中华鳖 3 个群体 mtDNA D-loop 区的核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 为 0.019 95, R 群体核苷酸多样性最大为 0.022 19, H 群体的核苷酸多样性最小为 0.007 09, S 群体居中,均大于 0.004 7。与其他龟鳖类 D-loop 区部分序列的核苷酸多样性相比,大于 *Chelydra serpentina* (0.000 56)<sup>[26]</sup>, *Deirochelys reticularia* (0.006)<sup>[27]</sup>, *Kinosternidae flavescens*, central plains (0.006)<sup>[28]</sup>, *Macrolemys temminckii* (0.014 5)<sup>[29]</sup>, *Sternotherus depressus* (0.007)<sup>[30]</sup>, *Sternotherus minor* (0.017)<sup>[31]</sup>, 小于 *Kinosternidae flavescens* (0.039)<sup>[28]</sup>。综上可知,目前中华鳖群体遗传多样性较丰富,且 R 群体的遗传多样性丰富度大于 H 群体和 S 群体。

从表 6 各群体的遗传分化指数  $F_{ST}$  可知, R 群体和 H 群体的  $F_{ST}$  值最小为 0.02817, S 群体与 R 群体和 H 群体的  $F_{ST}$  值分别为 0.417 39 和 0.675 39。可见 R 群体和 H 群体两者遗传分化较小,存在着较高的基因流水平,而 S 群体与 R 和 H 群体的基因交流水平较低。同时,根据 Shaklee 等<sup>[32]</sup>发表的资料,提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离  $P$  值分别为 0.90, 0.30 及 0.05 的分类判据。本实验结果显示,单倍型间的平均遗传距离为 0.027,可见其遗传分化尚未达到种群分化的水平。

#### 参考文献:

- [1] 王培潮. 中国的龟鳖[M]. 上海:华东师范大学出版社,2000.
- [2] 黄丽英,何中央,丁诗华,等. 中华鳖种质资源的研究现状及保护、利用对策[J]. 宁波大学学报:理工版,2005,18(2):183-186.
- [3] Cano R L, Brown W M, Wilson A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA [J]. Genetics, 1984, 106: 479-499.
- [4] Travis C G, Joseph L S, Alex T V, et al. Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in Crocodylians[J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 294: 312-324.
- [5] Grunwald C, Stabile J, Waldman J R. Population genetics of short nose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 1885-1898.
- [6] Ovenden J R, Lloyd J, Newman S J. Spatial genetic subdivision between northern Australian and southeast Asian populations of *Pristipomoides multidens*: A tropical marine reef fish species [J]. Fisheries Research, 2002, 59: 57-69.
- [7] 黄原. 分子系统学—原理、方法及应用[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [8] 刘小燕. 川渝黔 6 个山羊品种 mtDNA D-loop 遗传多样性与系统进化研究[D]. 重庆:西南大学,2008.
- [9] 李思发,吕国庆,李晨虹,等. 华东地区中华鳖地方种群 mtDNA 多态分析[J]. 中国水产科学,1997,4(3):1-6.
- [10] 张海琪,黄丽英,何中央,等. 中华鳖太湖养殖种群和日本引进种群线粒体 DNA Cytb 基因片段序列分析及分子进化初探[J]. 动物分类学报,2006,31(2):264-268.
- [11] 张永正,张海琪,何中央,等. 中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 5 个不同地理种群细胞色素 *b* 基因序列变异及种群遗传结构分析[J]. 海洋与湖沼,2008,39(3):234-239.
- [12] 陈合格,刘文彬,李建中,等. 三种鳖线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因序列的比较分析[J]. 水生生物学报,2006,30(4):380-385.
- [13] 陈合格,刘文彬,张轩杰. 中华鳖与砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因序列的比较分析和分子鉴定标记[J]. 水产学报,2005,29(3):23-912.
- [14] 陈合格. 三种鳖线粒体 DNA 部分基因序列的比较分析和分子鉴定标记[D]. 湖南:湖南师范大学,2005.
- [15] 王忠华,尹尚军,高佳,等. 中华鳖群体 DNA 指纹分析中的 RAPD 技术优化[J]. 中国水产科学,2010,17(6):1346-1351.
- [16] Lee H, Cho S N, Bang H E, et al. Molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Korea by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism sequence analysis [J]. The International Journal of Tuberculosis Lung Disease, 1998, 2(7): 585-589.
- [17] Kim B J, Kim S Y, Park B H, et al. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single-strand conformation

- polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(2):492-494.
- [18] Mannen H, Kojima T, Oyama K, *et al.* Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese black cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 1998, 76(1):36-41.
- [19] Mannen H, Morimoto M, Oyama K, *et al.* Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese black cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81:68-73.
- [20] 王艳艳,张辉,向文胜. PCR-SSCP 技术及其在植物研究中的应用 [J]. *生物信息学*, 2008, 6(1):40-42.
- [21] 彭巧玲,蒲友光,王志方,等. 中华鳖线粒体基因组序列分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(5):591-596.
- [22] Rosel P E, Dizon A E, Haygood M G. Variability of the mitochondrial control region in population of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* on interoceanic and regional scales [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1995, 52(6):1210-1219.
- [23] Nei J E, Avise J C. Application of random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation [J]. *Genetics*, 1993, 135(4):1209-1220.
- [24] 彭珊,代应贵. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性 [J]. *水产学报*, 2009, 33(2):196-200.
- [25] Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in south west China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism [J]. *Biochemical Genetics*, 1993, 31:51-60.
- [26] Walker D, Moler P E, Buhlmann K A, *et al.* Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*) [J]. *Animal Conservation*, 1998, 1(1):55-60.
- [27] Walker D, Avise J C. Principles of phylogeography as illustrated by freshwater and terrestrial turtles in the southeastern United States [J]. *Annual Review Ecology Systematics*, 1998, 29:23-58.
- [28] Serb J M, Phillips C A, Iverson J B. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinostemon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18:149-162.
- [29] Roman J, Santhuff S D, Moler P E, *et al.* Population structure and cryptic evolutionary units in the alligator snapping turtle [J]. *Conservation Biology*, 1999, 13(1):135-142.
- [30] Walker D, Orti G, Avise J C. Phylogenetic distinctiveness of a threatened aquatic turtle (*Sternotherus depressus*) [J]. *Conservation Biology*, 1998, 12(3):639-645.
- [31] Walker D, Burke V J, Barak I, *et al.* A comparison of mtDNA restriction sites vs. control region sequences in phylogeographic assessment of the musk turtle (*Sternotherus minor*) [J]. *Molecular Ecology*, 1995, 4:365-373.
- [32] Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins [J]. *Pacific Science*, 1982, 36(2):141-157.

## The genetic diversity of mitochondrial DNA D-loop region of three geographical populations in *Trionyx sinensis*

HUANG Xue-zhen<sup>1,2</sup>, QIAN Guo-ying<sup>2\*</sup>, LI Cai-yan<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

**Abstract:** *Trionyx sinensis* is regarded as a very important fishery animals with high economic value. However, the germplasm resources of *Trionyx sinensis* are exposed to admixture and degeneration due to the booming industry. The investigation of genetic diversity of *Trionyx sinensis* is beneficial to protect the germplasm resources. In the present study, the variation and genetic diversity of mtDNA D-loop region partial sequences in three geographical populations of *Trionyx sinensis* were analyzed by PCR combined with DNA sequencing and SSCP techniques. The average contents of A + T (65.4%) were higher than that of G + C (34.6%). A total of 7 variable sites (about 5.7% of the total nucleotides in the sequence) were detected in 25 individuals, and the value of si/sv was 2.76. The nucleotide diversity ( $\pi$ ) of the 25 individuals was 0.019 95, and the average number of nucleotide differences ( $K$ ) of them was 2.453. The 25 individuals belonged to 6 haplotypes according to the determined sequences. The haplotype diversity ( $H_d$ ) was 0.707, and the average genetic distance ( $P$ ) among the haplotypes of the species was 0.027. The analysis of phylogenetic tree with the method of UPGMA showed that the 6 haplotypes were clustered into three groups. Our data indicated that the variation and genetic diversity were high in the three populations of *T. sinensis*, in which the genetic diversity of Japanese population was richer than that of Huanghe and Huangsha population, and the genetic distance between Huangsha population and the other two populations was far. Moreover, we found that two types of electrophoretic patterns could be detected by PCR-SSCP, and all type II were Japanese population, suggesting the effective application of PCR-SSCP method in 78 TT  $\longleftrightarrow$  AA transversion mutation sites testing.

**Key words:** *Trionyx sinensis*; mitochondrial DNA; D-loop region; genetic diversity; PCR-SSCP

**Corresponding author:** QIAN Guo-ying. E-mail: qiangy@zwu.edu.cn