

丁鲷不同群体间形态学差异与随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析

凌去非^{1,2} 李思发¹ 乔德亮¹

(1 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; 2 苏州大学生命科学学院, 苏州 215123)

摘要: 采用聚类分析、主成分分析和判别分析 3 种数理统计方法, 对我国新疆朱家湖丁鲷群体、73 水库丁鲷群体和从捷克引进我国的丁鲷群体的可量性状和框架参数进行分析。聚类分析和主成分分析显示, 朱家湖群体与 73 水库群体较为接近, 而捷克群体与前两群体相距较远。判别分析亦可将捷克群体与前两群体分开, 准确率达 100%。从 60 个随机引物中筛选出的 20 个引物对丁鲷朱家湖群体、73 水库群体和捷克群体进行了随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析。引物 S440 在捷克群体扩增出的 450bp 片段为该群体特有的标记片段。朱家湖群体、73 水库群体、捷克群体多态位点比例分别为 24%、22.67% 和 18.42%; 群体内遗传相似度分别为 0.8967、0.9035 和 0.9309; 遗传多态度(π)分别为 0.1539、0.1489 和 0.1142。表明朱家湖群体保持着较高的遗传变异。三群体间的遗传相似度为 0.6868—0.9496, 群体遗传分化系数(F_{st})为 0.048—0.238, 分子方差分析发现群体内方差占总方差的 83.96%, 群体间的方差只占 16.04%, 由此推断三群体间遗传分化并不大。

关键词: 丁鲷; 遗传多样性; 形态学; 多态位点比例; 随机引物扩增多态 DNA

中图分类号: Q346 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2006)05-0578-09

在鱼类, 传统的形态学分析方法是通过可数性状及可量性状单一地进行比较, 这对物种鉴别较为有效, 但对种群的鉴别往往无能为力^[1]。而聚类分析、判别分析等多元分析能够较好地说明鱼类种群间形态学差异程度, 准确地鉴定种群^[2]。

RAPD 技术, 即随机扩增多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术, 是 Williams 等^[3] 和 Welsh 等^[4] 在 PCR 技术的基础上同时发展起来的, 用于检测基因组 DNA 多态性。目前该技术已被广泛应用于鱼类等水生动物群体遗传学的研究^[5-8]。

丁鲷 (*Tinca tinca*) 隶属于鲤科、雅罗鱼亚科、丁鲷属。丁鲷是一种广温性鱼类 (0—37 °C)^[9-10]。广泛分布于欧洲各地, 在我国仅分布于新疆额尔齐斯河流域。1999 年, 湖北省水产研究所从捷克引进丁鲷进行养殖和繁殖, 并向我国西部地区推广养殖。然而, 由于对我国原有的丁鲷群体遗传背景缺乏了解, 对于引进的丁鲷群体与我国原有的丁鲷群体的影响尚未进行合理的评估。因此, 本研究以我国新疆朱家湖、73 水库两个地方丁鲷群体和引进的捷克

丁鲷群体为实验材料, 以聚类分析、判别分析和主成分分析方法为主, 卡方 (χ^2) 分析为辅, 对传统方法测定的可数性状与可量性状、现代方法测定的框架数据, 共三类 28 个参数, 进行综合分析, 比较我国新疆两个丁鲷群体以及从捷克引进的丁鲷群体的差异, 以建立丁鲷不同群体间的形态学鉴别方法。同时, 采用 RAPD 技术对以上三个丁鲷群体进行了遗传差异分析, 以期从形态和分子遗传学多个层面了解丁鲷的遗传背景, 为我国的丁鲷资源的保护和合理利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新疆朱家湖丁鲷群体标本于 2001 年 8 月取自新疆维吾尔自治区福海县的朱家湖, 面积 213 hm², 属额尔齐斯河水系 (以下简称朱家湖群体)。新疆 73 水库丁鲷群体标本于 2002 年 11 月采自新疆维吾尔自治区福海县 73 水库, 面积 200 hm², 属乌伦古河水系 (以下简称 73 水库群体)。引进丁鲷群体标本

收稿日期: 2005-04-27; 修订日期: 2005-09-15

资助项目: 新疆生产建设兵团科委农业科学研究与技术开发项目 (编号: NKB02N10NK16XM)

作者简介: 凌去非 (1965—), 男, 江苏丹阳人, 副教授, 博士, 研究方向: 鱼类种质资源。E-mail: lingqf@suda.edu.cn

通讯作者: 李思发, E-mail: lsf038@mail.online.sh.cn

由湖北省水产研究所于 2002 年 10 月提供, 该群体系于 1998 年从捷克引进, 2002 年繁殖的子代 (以下简称捷克群体), 形态测量样本数及体长、体重范围如表 1 所示。

表 1 丁鱥三群体形态测量样本数及体长、体重范围
Tab 1 Sampling size and ranges of standard length, body weight of three populations of tench for morphological measurement

群体 Population	样本数(尾)Sampling size	体长(cm)Standard length		体重(g) Body weight	
		范围 Ranges	均值±SE Mean±SE	范围 Rages	均值±SE Mean× ±SE
朱家湖 Zhujiahu Lake	40	15.3—21.1	18.1±0.2	87.0—217.0	147.2±5.6
73 水库 73 Reservoir	28	11.6—16.5	14.2±0.3	36.0—105.0	69.2±3.7
捷克 Czech	32	11.8—15.7	13.2±0.2	43.6—97.2	61.0±2.4

1.2 方法

性状数据测量与处理

所测量的数据分为两类, 一类是传统形态学数据, 包括可数性状和可量性状。可数性状分别为背鳍条数、胸鳍条数、腹鳍条数、臀鳍条数、侧线鳞、侧线上鳞、侧线下鳞、第一鳃弓外侧鳃耙数。可量性状包括全长、体长、体厚、体高、头长、吻长、眼径、眼间

距和体重。另一类为框架数据, 共 20 项, 框架测点参考李思发^[1]等的文章。

可数性状用 SPSS10.0 进行一对一 χ^2 检验。可量性状中的 8 个性状 (不含体重) 与框架的 20 个参数合在一起, 共 28 个参数, 用聚类分析、判别分析和主成分分析三种方法进行分析, SPSS 10.0 软件^[11]处理。为了消除鱼体规格大小对各参数值的影响, 先

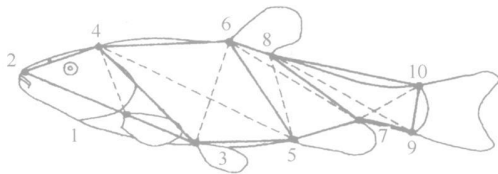


图 1 丁鱥框架测量图

Fig. 1 Drawing for measuring truss network of tench

注: 10 个定位点之间的距离为 20 个框架参数。例如, D_{2-4} 表示定位点 2 与 4 之间的距离 (20 truss parameter measurements are the distance between the two of 10 landmark points. For example, D_{2-4} denotes the distance between landmark 2 and 4). 定位点 (Landmark points): 1. 胸鳍起点 (Origin of pectoral fin) 2. 吻前端 (Tip of snout) 3. 腹鳍起点 (Origin of pelvic fin) 4. 额部有鳞部最前缘 (Most anterior of scales on skull) 5. 臀鳍起点 (Origin of anal fin) 6. 背鳍起点 (Origin of dorsal fin) 7. 臀鳍末端 (Terminus of anal fin) 8. 背鳍末端 (Terminus of dorsal fin) 9. 尾鳍腹部起点 (Ventral origin of caudal fin) 10. 尾鳍背部起点 (Dorsal origin of caudal fin)

将每尾鱼的所有参数除以它的全长值予以校正, 再分别求出各组样本每个参数的平均校正值, 用平均校正值作聚类分析。所采用的聚类方法为欧氏距离的最短距离系统聚类法。判别分析与主成分分析时所用数据的处理同聚类分析。主成分贡献率与累计贡献率的计算参照张尧庭等^[12]。

判别准确率的计算
判别准确率 P_1 = 判别正确的尾数 / 实际尾数,
 P_2 = 判别正确的尾数 / 判别尾数

综合判别率 =
$$\sum_{i=1}^k A_i / \sum_{i=1}^k B_i$$

式中: A_i 为第 i 个群体判别正确的尾数, B_i 为每 i 群体的实际尾数, k 为群体数。

随机扩增 DNA

总 DNA 提取与 RAPD 扩增

从酒精中取出尾鳍, 剪其边缘部分, 切碎。用酚/氯仿法提取基因组 DNA。PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行, 反应体系为 3 μ L buffer (100mmol/L tris-HCl, pH9.5, 500mmol/L KCl, 30mmol/L MgCl₂, 0.01% 的明胶, 最后调 pH 值为 9.0), 1 μ L 四种 dNTP (2.5mmol), 2 μ L 引物 (5 μ mol/L), 2 μ L 基因组 DNA (约 40—200ng), 1.2U TaqDNA 聚合酶, 16.4 μ L 无菌水, 总反应体积为 25 μ L, 加入 20 μ L 石蜡

油。循环程序为: 94℃预变性 3min; 94℃ 45s, 36℃ 45s, 72℃ 90s, 45 个循环, 72℃延伸 10min。

取 8μL 扩增产物经 1.5%进口分子生物学琼脂糖凝胶(含适量 EB)电泳, 电泳缓冲液为 1×TBE, 电压为 4.5 V/cm, 经 2.5 h 后, 用 Gene-Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析。

数据处理

多态位点百分率(P)的计算。(其中, k 为多态位点数; n 为所测位点总数)。

$$P = k / n \times 100\%$$

遗传相似度(S)与遗传距离(D)根据 Nei(1979) 等的公式计算(其中 N_{xy} 是个体 X 和 Y 共同拥有的带数, N_x 和 N_y 分别是个体 X 和 Y 所具有的总带数):

$$S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$
$$D = 1 - S$$

群体内、群体间的平均遗传相似度和遗传距离通过对各群体内和群体间各个个体间的 S 和 D 值简单平均求得。

经电泳获得的 RAPD 图谱中的每一条带代表一个引物的结合位点, 每群体在所有位点的谱带式样组成一个(0 或 1)矩阵。用 Arlequin 2.0 软件进行分子方差分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA), 计算遗传多态度(π)和遗传分化指数(F_{st})^[13]。

根据群体间的遗传距离, 用 MEGA2 软件包非加权的组平均法(UPGMA)程序对三个群体进行聚类分析^[14]。

2 结果

2.1 群体间形态差异可数性状

表 2 三群体丁鱥可数性状均值
Tab. 2 Means of meristic characters of three populations of tench (Mean±SE)

特征 Character	朱家湖 Zhujiahu	73 水库 73 Reservoir	捷克 Czech
侧线鳞数 Scale number of lateral line	100.57±0.64	101.07±0.51	94.47±0.70
侧线上鳞 Scale number above lateral line	27.10±0.37	29.54±0.25	28.03±0.37
侧线下鳞 Scale number beneath lateral line	19.65±0.24	19.96±0.29	17.91±0.27
背鳍条数 Number of soft dorsal fin	8.93±0.06	8.43±0.10	9.13±0.07
胸鳍条数 Number of pectoral fin	13.98±0.16	14.04±0.10	13.56±0.23
腹鳍条数 Number of pelvic fin	8.03±0.04	8.79±0.11	9.13±0.15
臀鳍条数 Number of anal fin	7.68±0.08	7.82±0.07	7.47±0.12
第一鳃弓外侧鳃耙数 Number of rakes of first outward gill arch	12.50±0.16	12.86±0.22	13.19±0.24

三群体丁鱥可数性状均值见表 2。经 χ^2 检验, 捷克群体与朱家湖、73 水库两群体除侧线鳞、侧线

下鳞有显著差异外, 其他特征在群体间无显著差异。可量性状与框架数据

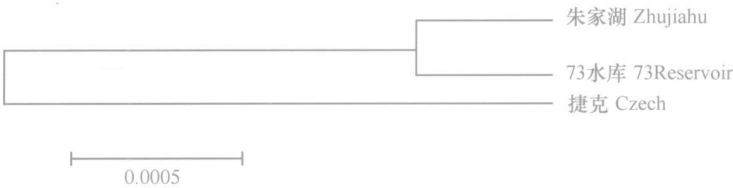


图 2 丁鱥三群体聚类分析图
Fig. 2 Cluster dendrogram of three populations of tench

图 2 是三个群体根据形态特征的聚类结果。从图中可以发现朱家湖群体与 73 水库群体在形态上较为相近, 而捷克群体与其他两群体相比, 在形态上有较大的差异。

判别分析

将常规可量数据与框架数据相结合进行判别, 判别效果非常显著 ($P < 0.01$), 说明三群体在形态方面有显著差异。判别准确率 P_1 为 95%—100%,

其中, 捷克群体 (100%) > 73 水库群体 (96.4%) > 朱家湖群体 (95%)。综合判别率为 97%。判别准确度 P_2 为 90%—100%, 其中, 捷克群体 (100%) > 73 水库群体 (96.4%) > 朱家湖群体 (90%)。综合判别率为 95%。

为提高判别公式的实用性, 从 28 个校正的形态参数中选出对判别贡献较大的 9 个参数进行判别, 9 个参数对应形态测量参数和 F 检验值列于表 3。

表 3 判别分析中贡献较大的 9 个参数
Tab 3 9 Parameters with high contribution in discriminant analysis

参数 Parameter	V_{25}	V_{27}	V_{20}	V_2	V_{13}	V_{18}	V_{26}	V_5	V_4
形态性状	眼径	尾柄长	D_{8-1}	D_{1-3}	D_{7-1}	D_{4-6}	眼间距	D_{3-6}	D_{3-4}
Traits									
F 检验值	56.835	55.915	49.511	45.437	41.596	39.402	37.013	35.987	34.553
F value									

利用挑选过的 9 个参数建立的判别方程为
朱家湖群体 = $918.076 V_2 + 1590.707 V_4 + 88.208 V_5 + 1287.649 V_{13} + 1231.650 V_{18} + 1331.112 V_{20} + 2071.257 V_{25} + 3198.559 V_{26} + 249.146 V_{27} - 1047.37$
73 水库群体 = $874.017 V_2 + 1674.176 V_4 + 264.361 V_5 + 888.710 V_{13} + 1313.705 V_{18} + 1196.749 V_{20} + 3053.510 V_{25} + 2818.711 V_{26} + 414.038 V_{27} -$

1054.17
捷克群体 = $1059.271 V_2 + 1823.015 V_4 + 141.032 V_5 + 1007.641 V_{13} + 1170.641 V_{18} + 1202.790 V_{20} + 3124.668 V_{25} + 3163.375 V_{26} - 36.238 V_{27} - 1076.81$
将各测量指标除以全长值进行校正后, 分别代入 3 个判别方程中, 可求出 3 个判别方程的值, 哪一个判别方程的值最大, 该尾鱼即属于哪一个群体。

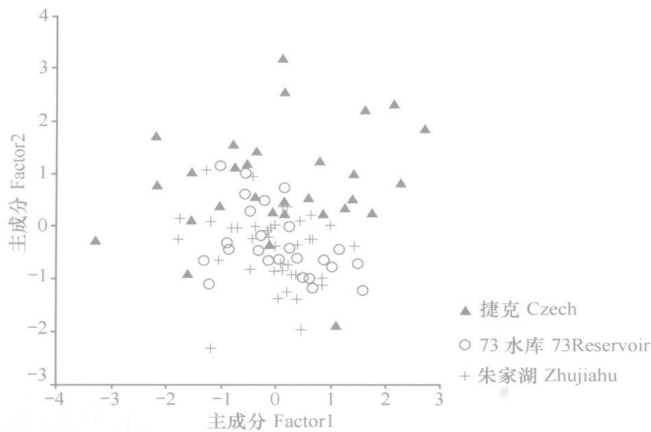


图 3 丁鱥三群体主成分分析图
Fig 3 Maps of principal component analysis of three populations of tench

主成分分析

在主成分分析中, 三个主成分对不同群体间总变异方差的贡献率分别为, 主成分(1)19.14%、主成分(2)14.25%、主成分(3)9.27%, 累计贡献率为

42.67%。三个主成分累积贡献率低, 说明难以用几个相互独立的因子来概括三个不同群体的差异。主成分(2)对主成分(1)作图结果见图 3, 从图中可以看出, 朱家湖群体和 73 水库群体重叠区较多, 难以

完全分开,而捷克群体与其他两群体有较大的差异,而且,不难发现捷克群体基本位于主成分(2)=0.0水平线的上方,其他两群体则多位于该水平线的下方。

用主轴因子提取法,经平均正交旋转的因子负荷矩阵进一步分析,发现主成分(1)主要包括 D_{3-6} 、 D_{3-4} 、 D_{7-8} 、 D_{7-6} 、 D_{5-6} 、 D_{5-8} 、 D_{9-10} 、 D_{7-8} 和体高、尾柄高等指标,即主要反映鱼体垂直轴向的形态变化;主成分(2)包括 D_{7-9} 、 D_{1-4} 、 D_{9-10} 、 D_{9-8} 、尾柄长,即主要反映鱼体水平轴方向的形态变化;主成分(3)包括头长、眼径、 D_{3-4} 、 D_{1-2} ,即主要反映鱼体头

部的形态变化。

2.2 随机扩增 DNA

PCR 结果

本研究从 60 个随机引物中筛选出扩增带清晰、重复性好的引物 20 个,其中 9 个引物为多态引物,其余 11 个引物为单态引物(表 4)。各引物扩增的带数在 3—12 之间,共产生 153 个重复性好且带型清晰的 RAPD 扩增带,其分子量在 330—2460 bp 之间。在检测到的 153 位点中,有 76 个位点在三个群体中表现出稳定的一致性,它们是进化中较为保守的区域。

表 4 随机引物及其扩增情况
Tab. 4 Random primers and their RAPD amplification

引物 Primer	序列 5'-3' Sequence	扩增带数 No. of fragments	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence	扩增带数 No. of fragments
S11	GTAGACCGCT	6—10	S88	TCACGTCCAC	6
S12	CCTTGACGCA	5	S122	GAGGATCCCT	3—5
S25	AGGGGTCTTG	10	S123	CCTGATCACC	4—7
S27	GAAACGGGTG	5—9	S124	GGTGATCAGG	7
S28	GTGACGTAGG	6	S125	CCGAATTCCC	4—8
S29	GGGTAACGCC	8	S128	GGGATATCGG	6—9
S31	CAATCGCCGT	5—7	S201	GGGCCACTCA	7
S51	AGCGCCATTG	5	S226	ACGCCCCAGGT	5
S52	CACCGTATCC	5—12	S295	AGTGGCCCTT	10
S68	TGACCGGTG	7	S440	GCTGCTCCGT	7—10

RAPD 分子标记

引物 S440 在新疆朱家湖群体和 73 水库丁鱥群体中扩增出 8 条带,在捷克群体扩增出 9 条带,其中

450bp 片段为捷克群体特有,即捷克群体的特有分子标记(图 4)。

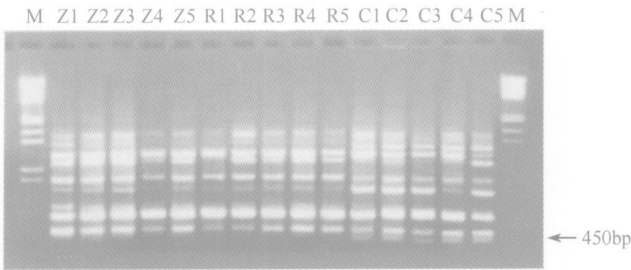


图 4 引物 S440 扩增的丁鱥 RAPD 图谱

Fig 4 RAPD products generated from the genomic DNA of tench using primer S440
M: DNA 标准分子(λ DNA *ECOR* I+*Hind* III); Z1、Z2、Z3、Z4、Z5: 朱家湖群体; R1、R2、R3、R4、R5: 73 水库群体; C1、C2、C3、C4、C5: 捷克群体
M: marker(λ DNA *Eco*RI *HIND* III); Z1、Z2、Z3、Z4、Z5: Zhujiahu population; R1、R2、R3、R4、R5: 73 Reservoir population; C1、C2、C3、C4、C5: Czech population

RAPD 属显性遗传, 即标记片段的有和无分别为显性和隐性, 纯合子和杂合子均产生相同的扩增带。本研究发现一个鉴别标记在新疆两丁鲶群体中为隐性纯合, 在捷克群体中则为显性纯合或杂合, 运用这个隐性标记鉴定新疆丁鲶群体可以排除这个位点上的杂合子, 鉴别准确性要高于一个显性标记。

DNA 多态性与遗传分化

根据获得的 RAPD 扩增带, 计算不同群体的多态位点比例, 三群体多态位点比例为 18.42%—24%, 新疆朱家湖群体最高, 73 水库群体次之, 捷克群体最低。以群体内不同扩增图谱类型之间的遗传差异值为基础, 计算群体内的遗传多态度 H , 三个群体的多态度在 0.1142—0.1539 之间, 平均为 0.1390。新疆朱家湖群体最高, 73 水库群体次之, 捷克群体最低 (表 5)。

表 5 丁鲶三群体多态位点比例与遗传多态指数 H			
Tab. 5 Proportion of polymorphic loci and the genetic diversity index(H) from three populations of tench			
	朱家湖 Zhujiahu	73 水库 73Reservoir	捷克 Czech
总位点数	150	150	152
Total loci			
多态位点数	36	34	28
Na of polymorphic loci			
多态位点比例%	24.00	22.67	18.42
Proportion of polymorphic loci			
遗传多态度/ H (平均值 \pm 标准误)	0.1539 \pm 0.0828	0.1489 \pm 0.0802	0.1142 \pm 0.0626
Genetic diversity/ H (Mean \pm SE)			

对三群体进行分子方差分析 (AMOVA) 发现, 16.04% 的遗传变异来自于群体间, 83.96% 来自于群体内 (表 6)。

表 6 丁鲶三群体间方差分析				
Tab. 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) of three populations of tench				
变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	各方差所占比例 % Percentage of variation
群体间 Among populations	2	41.378	1.022	16.04
群体内 Within populations	42	224.800	5.352	83.96
总计 Total	44	266.178	6.374	

三群体间遗传分化指数 F_{st} , 以 73 水库群体和捷克群体最高 (0.238), 朱家湖群体与捷克群体次之 (0.187), 朱家湖群体与 73 水库群体最小 (0.048)。遗传相似度和遗传距离

丁鲶三个群体内的遗传相似度以捷克群体最大 (0.9309), 新疆 73 水库次之 (0.9035), 新疆朱家湖群体最小 (0.8967)。

丁鲶三群体间遗传距离依次为 73 水库群体与捷克群体 > 朱家湖群体与捷克群体 > 朱家湖水水库群体与 73 水库群体 (表 7)。

表 7 丁鲶三群体间遗传相似度和遗传距离			
Tab. 7 Genetic similarities and genetic distances between three populations of tench			
	朱家湖 Zhujiahu	73 水库 73Reservoir	捷克 Czech
朱家湖 Zhujiahu		0.0504	0.2300
73 水库 73 Reservoir	0.9496		0.3132
捷克 Czech	0.7700	0.6868	

聚类分析

根据三群体间的遗传距离, 用 UPGMA 构建聚类图发现, 先是朱家湖群体与 73 水库群体聚在一起, 然后再与捷克群体聚合 (图 5)。

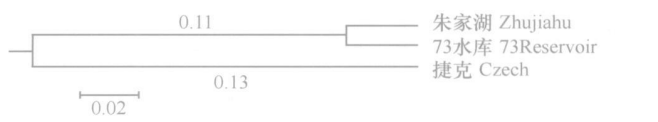


图 5 丁鲶三群体间的 UPGMA 聚类图
Fig. 5 The UPGMA dendrogram among three populations of tench

3 讨论

3.1 丁鲶朱家湖群体与 73 水库群体在形态上较为相近, 而捷克群体与前两群体则相距较远, 具体表现在: (1) 群体聚类分析中, 捷克群体与朱家湖、73 水库群体的形态距离远大于后两者的形态距离; (2) 在判别分析中, 73 水库与朱家湖两群体间有少量误判, 而捷克群体则无误判; (3) 在主成分分析中, 73 水库与朱家湖群体的重叠区较多, 而捷克群体与它

们的重叠区较少。这一结果与三群体的地理分布较为一致。

本研究应用三种多元分析方法:即聚类分析、判别分析和主成分分析。聚类分析是按物以类聚原则研究事物分类的一种多元统计分析方法,它根据样本的多指标、多个观察样品数据,定量地确定样品、指标之间存在的相似性,并据此联接这些样品或指标,归成大小类群,构成分类树结构图。与主成分分析相比,聚类分析充分利用原始数据信息,但它不区别地分析全部指标,无法排除误差的干扰。

判别分析是根据多种因素(指标)对事物的影响进行判别,是鱼类种群鉴定的常用方法,通过判别分析可以建立判别公式,对种群进行判别。本文采用逐步判别函数所依赖的诸因子进行合理选择,既考虑到各入选因子的重要性,又考虑到每选一个新因子对已入选因子的影响,并及时对已入选因子进行剔除与否的处理,这样就可以从大量的因子中挑选出若干必要的、组合最佳因子去建立判别函数。李勇等^[15]使用 14 个形态参数建立长江、辽河及瓯江三水系中华绒螯蟹幼蟹形态判别的平均拟合概率为 85.5%,使用 9 个形态参数的平均拟合概率为 80.4%,判别效果比较理想。本文用 28 个形态指标,平均判别率为 100%,用 9 个形态指标,平均判别率为 97%。由此可见,逐步判别法可以有效地区分丁₁、丁₂三个群体。

主成分分析是以各因素间的线性关系为基础,通过计算特征值与特征向量,找出既能概括各因素原有的全部信息,又相互独立的新的权利指标,即主成分。主成分分析的目的是希望从大量性状中找出几个主要方面(即主成分),从而使一个多性状的复杂问题转化为比较简单的问题,即对多维性状空间进行“压缩”,从而在较低维的主成分空间中对分类运算单位进行排序,同时对性状依次在主成分上的负荷量的大小排序,而使原始数据的信息损失最少。我们对三个丁₁、丁₂群体形态测量的 28 个性状指标进行主成分分析时,尽管前 3 个因子累计贡献率并不高(42.67%),但也能提供部分有用的信息。

总的说来,三种多元分析方法是相类似的,但它们从不同的侧面反映样品间或品系间的差异,因此,相互是不可替代的^[1]。

3.2 3 丁₁、丁₂群体遗传变异的比较

周泽扬等^[16]提出,当研究位点达到或超过 70 时,即能获得比较稳定可靠的信息。我们从 60 个随机引物中筛选出扩增条带清晰、重复性好的引物 20

个,研究位点为 153 个,所获得的结果较为可靠。对我国新疆朱家湖、73 水库两丁₁、丁₂群体与引进的捷克丁₁、丁₂群体的 RAPD 分析,发现我国新疆朱家湖群体内相似系数较低(0.8967),多态位点比例高(24%),遗传多态度 H 高(0.1539)。由此表明,朱家湖群体与其他两群体相比较,具有较高的遗传多样性。

遗传分化指数 F_{st} 和三群体间的距离显示,捷克群体与新疆朱家湖、73 水库两群体存在着一定的遗传分化。但是,通过分子方差分析(AMOVA)发现,群体内方差占总方差中 83.96%,群体间方差占总方差的 16.04%,由此可见,三群体间的遗传分化并不大。

朱家湖和 73 水库群体间的 F_{st} 为 0.048,与 Ward^[17] 关于同种海水鱼类不同群体间的 F_{st} (0.062)相近,表明这两个群体间存在着一定的个体迁移现象。73 水库与捷克群体间的遗传分化指数 F_{st} 为 0.238,与 Ward 提出的淡水鱼类不同群体间的遗传分化指数 F_{st} (0.222)相似,这表明,个体在这两个群体间的迁移存在着地理的屏障。对三群体的细胞色素氧化酶 II 亚基的测序分析也发现捷克群体部分个体享有独特的单倍型^[18]。

由遗传距离采用非加权的组平均法(UPGMA)对三群体进行聚类分析,发现朱家湖群体与 73 水库群体先聚在一起,然后再与捷克群体聚在一起,这一结果与三群体的地理分布相吻合,也间接地反映了三者的亲缘关系。

在生物界,远交衰退和近交衰退一样会产生较多的问题^[19]。外来基因的引入可能导致地域性适应丧失并引起所谓的“远交衰退”。在野生生物的管理中,从保持完整性和纯洁性看,通常不应将遗传分歧大的物种或种群进行杂交。尽管丁₁、丁₂的捷克群体与我国新疆两地方群体间的遗传分化较小,但是,捷克群体内遗传多样性比新疆两群体还要小,因此,从资源保护角度出发,应防止捷克群体可能对我国丁₁、丁₂天然资源造成的污染。

致谢:本研究 丁₁、丁₂捷克群体由湖北省水产研究所王佳喜研究员馈赠,研究过程中得到上海水产大学王成辉博士、刘至治博士、姚化章和新疆建设兵团农十师额河特种鱼类繁育场蔡晓琴、李的帮助,谨致谢意。

参考文献:

- [1] Li S F, Li C H, Li J L. Analysis of morphological variations among

- strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, **44**(4): 450—457 [李思发, 李晨虹, 李家乐, 尼罗罗非鱼品系间形态差异分析. 动物学报, 1998, **44**(4): 450—457]
- [2] Yu J H, Xia D Q, Yang H, *et al*. Morphology of the progenies of *Oreochromis aurea* (♀) × *Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, **27**(5): 431—435 [俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等. 奥利亚罗非鱼(♀) × 鳊(♂)杂交后代的形态. 水产学报, 2003, **27**(5): 431—435]
- [3] Williams G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**: 6531—6535
- [4] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**: 7213—7218
- [5] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, *et al*. Detection genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers [J]. *Heredity*, 1992, **69**: 465—472
- [6] 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, 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]
- [7] Zhang S M, Deng H, Wang D Q, *et al*. Population structure and genetic biodiversity of silver carp and grass carp from populations of Yangtze River systems revealed by RAPD [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4): 324—330 [张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 324—330]
- [8] Zhu X P, Du H J, Zhou L. Genetic diversity analysis of Chinese three-keeled pond turtle (*Chinemys reevesii*) by RAPD [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 167—171 [朱新平, 杜合军, 周莉, 等. 乌龟遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 167—171]
- [9] Yang G R, Huang H J. Leuciscinae [A]. Wu X W (ed): The annals of Cyprinidae fishes in China [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1982, 10—11 [杨干荣, 黄宏金. 雅罗鱼亚科. 伍献文主编. 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 10—11]
- [10] Flajshans M, Kohlmann K, Lechta V, *et al*. Genetic aspects of breeding and gene resources conservation of tench, *Tinca tinca* (L.) [J]. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 1998, **45**(3): 289—301
- [11] Cheng P Y, Huang Z M. The tutorial of SPSS10.0 [M]. Beijing: People's Surgeon Press, 2002 [陈平雁, 黄浙明. SPSS10.0 统计软件应用教程. 北京: 人民军医出版社, 2002]
- [12] Zhang L T, Fang K T. Introduction of multiple analysis [M]. Beijing: Science Press, 1982, 393—401 [张尧庭, 方开泰. 多元统计分析引论. 北京: 科学出版社, 1982, 393—401]
- [13] Excoffier L. Analysis of molecular variance (AMOVA) version 2.0. Genetics and biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland
- [14] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al*. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**(12): 1214—1245
- [15] Li Y, Li S F, Wang C H, *et al*. Establishment and application of morphological discrimination model for juveniles *Enicospira sinensis* from Liaobe, Yangtze and Qujiang rivers [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(1): 120—126 [李勇, 李思发, 王成辉, 等. 三水系中华绒螯蟹幼蟹形态判别程序的建立和使用. 水产学报, 2001, **25**(1): 120—126]
- [16] Zhou Z Y, Xia Q Y, Liu C, *et al*. The correlation between the number of RAPD-loci and the reliability of the information on genetic variation in molecular phylogenetic studies [J]. *Heredity*, 1998, **20**(5): 12—15 [周泽扬, 夏庆友, 鲁成, 等. 分子系统学研究中分子位点与遗传差异信息可靠性的关系. 遗传, 1998, **20**(5): 12—15]
- [17] Ward R D, Woodward M, Skillein D O F. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes [J]. *J. Fish Biol.*, 1995, **44**: 213—232
- [18] Ling Q F. The genetic diversity of *Tinca tinca* and its exploitation [D]. Ph.D thesis, Shanghai Fisheries University, 2003 [凌去非. 丁𩰾遗传多样性和开发利用的研究. 上海水产大学博士论文, 2003]
- [19] Montalvo A M and Ellstrand N C. Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae) [J]. *Am. J. Bot.*, 2001, **88**: 258—269

MORPHOLOGICAL VARIATION AND RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) ANALYSIS OF DIFFERENT POPULATIONS OF *TINCA TINCA*

LING Qu-Fei^{1,2}, LI Si-Fa¹ and QIAO De-Liang¹

(1 Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certified by
Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090

2 School of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123)

Abstract: The morphological and truss network characters of three populations of *Tinca tinca*, e. g., two indigenous populations from Zhujiahu Lake and 73 Reservoir of Xinjiang, China, and one exotic population from Czech, were studied by three multivariate analysis (cluster analysis, discriminant analysis and principal component analysis). The results showed that Zhujiahu population has a close relationship with 73 Reservoir population, and Czech population is far from other two populations. This was in accord with the geographical distribution of the three populations.

With 20 primers screened out from 60 primers using RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique, these three populations were analyzed. The proportions of polymorphic loci of Zhujiahu Lake, 73 Reservoir and Czech were 24%, 22.67% and 18.42% respectively. The genetic diversity index (H) was 0.1539, 0.1489 and 0.1142 respectively. These indicated that Zhujiahu population had higher genetic diversity than the others. The genetic similarity among three populations was 0.6868—0.9496. The fixation index (F_{st}) was 0.048—0.238. Variation within population accounted for 83.96% of total variation and variation between populations was only 16.04% of total variation. It was concluded, accordingly, that the genetic differentiation among three populations was low.

Key words: *Tinca tinca*; Genetic diversity; Morphology; Proportion of polymorphic loci; Random amplified polymorphic DNA (RAPD)