

文章编号: 1004-7271(2006)04-0390-08

利用 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 标记技术分析 长江口刀鲚的群体遗传结构

张媛^{1,2}, 胡则辉^{1,2}, 周志刚^{1,2}, 陈亚瞿³

(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. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

3. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 利用 RAPD-PCR 及 ISSR-PCR 两种分子标记技术对长江出海口两年 3 个群体的 52 条刀鲚 (*Coilia ectenes*) 进行群体遗传结构的分析。在 3 个群体中, 利用 RAPD-PCR 标记技术, 15 个 10 bp 随机引物共检测到 110 条带, 多态性为 0.490~0.657, Shannon 多样性指数为 18.63~22.38, Nei 平均遗传距离为 0.1195~0.1454; 而利用 11 个 ISSR 引物所获得的相应结果分别为 67、0.576~0.682、11.56~13.66 以及 0.117~0.147。相关性分析表明这两种技术所获得的上述数据呈正相关 ($r=0.95, P<0.05$)。AMOVA 结果显示, 3 个群体按采集时间划分成的两年之间的遗传变异不超过总变异的 1.1%, 同一年内群体间的遗传变异也分别只占总变异的 6.99% (RAPD-PCR) 和 2.75% (ISSR-PCR), 群体内各个体之间的遗传变异占总变异的 96% ($P<0.0001$), 说明两年内所采集的 3 个群体之间基本上没有产生遗传分化。基于样品之间的 Nei 遗传距离所构建的 Neighbor-joining 聚类图也清楚地显示出没有按采样的时间产生群体的遗传分化。对各样品之间的 Nei 遗传距离及 Neighbor-joining 聚类图分别经 Mantel 检测及支序分析, 发现 ISSR-PCR 技术所获得的结果与 RAPD-PCR 技术的结果不存在明显的正相关, 但 ISSR-PCR 标记技术具有在待测样品中能检测到高多态性等优点。

关键词: 刀鲚; 遗传多样性; 遗传变异; RAPD-PCR; ISSR-PCR; AMOVA

中图分类号: S 917; S 931.5 文献标识码: A

Population genetic structure of *Coilia ectenes* sampled from Yangtze River estuary revealed by RAPD-PCR and ISSR-PCR markers

ZHANG Yuan^{1,2}, HU Ze-hui^{1,2}, ZHOU Zhi-gang^{1,2}, CHEN Ya-qu³

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated

by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. College of Aqua-Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

3. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: Population genetic structure and genetic diversity of three populations of *Coilia ectenes* sampled from Yangtze River from 2002 to 2003 were revealed by RAPD-PCR and ISSR-PCR markers. There were 110 bands

收稿日期: 2005-12-27

基金项目: 长江口航道建设有限公司专题项目; 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 张媛 (1978-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水生生物种群遗传学。

通讯作者: 周志刚, Tel: 021-65710533, E-mail: zgzhou@shfu.edu.cn

occurring in the three populations assayed by RAPD-PCR with fifteen 10-base primers, and the polymorphism was from 0.490 to 0.657, Shannon diversity index was from 18.63 to 22.38, and mean Nei's genetic distance was from 0.1195 to 0.1454. In the meanwhile, there were 67 bands occurring in the three populations revealed by ISSR-PCR with 11 primers, and the polymorphism was from 0.576 to 0.682, Shannon diversity index was from 11.56 to 13.66, and mean Nei's genetic distance was from 0.1169 to 0.1467. These data respectively from the two markers were significantly positively correlated ($r = 0.95, P < 0.05$). AMOVA analysis showed that the genetic variation between sampling years of the three populations accounted for less than 1.1% of the total one, while this variation between populations sampled in one year accounted for 6.99% revealed by RAPD-PCR or 2.75% by ISSR-PCR of the total one. It also showed that the genetic variation among samples within a population was the principal component, which accounted for more than 96% of the total one at $P < 0.0001$ assayed by the both markers. AMOVA results suggested that there was no significantly genetic diversity among the three populations of *C. ectenes*, and this was confirmed by Neighbor-joining dendrogram constructed based on matrices of pairwise Nei's genetic distances among samples. Although the pairwise Nei's genetic distances among samples and the Neighbor-joining dendrogram from RAPD-PCR was not positively correlated with those from ISSR-PCR according to the Mantel test and the cluster analysis respectively, ISSR-PCR could reveal higher polymorphism in the tested populations.

Key words: *Coilia ectenes*; genetic diversity; genetic variation; RAPD-PCR; ISSR-PCR; AMOVA

刀鲚 (*Coilia ectenes*) 隶属于鲱形目、鲱科、鲚属, 俗称刀鱼, 是一种重要的经济鱼类, 我国各通海河流及沿海均有分布, 以长江产量最高, 但过度捕捞、水域生态环境变化及水质恶化等因素, 已严重威胁到刀鲚的渔业资源。以江苏镇江为例, 1994 年之前, 其捕捞量一直稳定在 110 t 以上, 1998 年已降到 20 ~ 30 t, 1999 年只有 15 t, 在捕捞的刀鲚中, 50 g 以上的个体在 1996 年约占 30%, 而到 1998 年仅占 10%^[1], 说明个体也逐渐变小。上海的崇明县也出现类似的情况^[2]。这些数据明确表明长江刀鲚渔业资源有衰退迹象, 应加强资源的保护和研究。对刀鲚渔业资源的保护, 普遍建议是通过行政干预或立法的手段, 限制其捕捞时间和强制使用合法的捕捞工具来达到其目的^[1-4]。但已衰退的刀鲚渔业资源在有效的保护后, 能否恢复? 这将涉及刀鲚的种群生物学问题。刘文斌^[5]曾对中国鲚属 4 种鱼的同工酶谱和形态作了比较研究, 马春艳等^[6]也利用随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 技术分析了长江口刀鲚单个群体的遗传多样性, 但对刀鲚种群的遗传结构等种群生物学问题, 人们还缺乏足够的了解。同时基于 ISSR-PCR (inter-simple sequence repeat PCR, ISSR-PCR) 这种分子标记的高重复性与稳定性及更强的特异性^[7,8], 以及在植物方面的广泛应用^[8-12], 而在水产动物中较少利用的现实^[13-17], 我们选用 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 遗传标记技术对 2002 年和 2003 年 3 次采集的 52 个刀鲚样品进行群体遗传结构的分析, 探讨产生变异的可能原因, 为长江口刀鲚种质资源的保护和恢复提供理论依据和指导作用, 同时还比较了该两种技术在刀鲚种群遗传学研究中存在的可能优、缺点。

1 材料与方法

1.1 实验样品

实验用的刀鲚 (*Coilia ectenes*) 样本由中国水产科学院东海水产研究所提供。样品数量为 52 个, 其中 2002 年分两次采集, 共 32 条, 第一次 19 条 (群体 1), 于 2002 年 4 月 16 日采集于长江口横沙岛, 第二次 13 条 (群体 2), 于 2002 年 5 月 14 日采集于长江口崇明岛。2003 年 4 月于长江口崇明岛采集一次, 共 20 条 (群体 3)。样品体长在 22 ~ 25 cm, 体重在 50 ~ 80 g 范围内。

1.2 肌肉组织的 DNA 提取

肌肉组织的 DNA 提取参照文献^[18]。提取的 DNA 经 70% 的乙醇洗涤, 干燥, 先加入 100 μ L TE₁₀

mmol/L Tris-HCl ,1 mmol/L EDTA ,pH 8.0)溶解 ,再加入 25 mg/mL 的 RNA 酶 A 溶液(无 DNA 酶活性) 2 μ L ,于 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h ,然后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 RAPD-PCR 扩增反应

RAPD-PCR 在日本 ASTEC 公司生产的 PC-701 型 PCR 扩增仪上进行。25 μ L PCR 反应体系包括 2.5 μ L PCR 扩增缓冲液(100 mmol/L KCl ,80 mmol/L (NH₄)₂SO₄ ,100 mmol/L Tris-HCl ,pH9.0 ,2.0 mmol/L MgCl₂) ,1 μ L 2.5 mmol/L dNTPs ,1 μ L 5 μ mol/L 引物(上海生工生物工程技术有限公司) ,50 ng 基因组 DNA ,1 U Taq DNA 聚合酶(上海生工生物工程技术有限公司)^[19]。80 条随机引物经筛选 ,其中 15 条(表 1)可以成功地用于 RAPD-PCR 扩增。扩增反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ,然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s ,36 $^{\circ}$ C 退火 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s 进行 45 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 RAPD-PCR 扩增反应中所筛选的随机引物序列及在刀鲚各群体中的扩增条带数

Tab.1 The sequence of random primer chosen for RAPD-PCR , and the amplified bands in the three populations of *Coilia ectenes*

引物	引物序列 (5'→3')	多态性条带数/总条带数		
		群体 1	群体 2	群体 3
S5	TGGGCCCTTC	4/6	4/6	6/7
S20	CGGACCCCTA	5/6	5/6	5/6
S29	GGGTAACGCC	5/9	3/9	5/9
S31	CAATCGCCGT	4/6	4/6	4/6
S67	GTCCCGACGA	0/2	0/2	1/2
S73	AAGCCTCGTC	2/4	2/5	5/5
S126	GGGAATTCGG	5/7	6/8	6/7
S329	CACCCAGTC	1/3	1/3	3/6
S339	GTGCGAGCAA	2/8	1/7	2/8
S7	GGTGACGCAG	6/9	5/9	7/10
S13	TCCCCCGCT	5/10	6/10	6/10
S38	AGGTGACCGT	6/10	3/9	7/10
S425	ACTGAACGCC	4/7	2/7	5/7
S429	TGCCGGCTTG	4/7	4/7	4/6
S501	TGCGGGTCCT	7/9	4/8	5/9
Total		60/103	50/102	71/108

1.4 ISSR-PCR 扩增反应

ISSR-PCR 仍在上述 PCR 扩增仪上进行。25 μ L PCR 反应体系包括 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液(100 mmol/L KCl ,80 mmol/L (NH₄)₂SO₄ ,100 mmol/L Tris-HCl ,pH 9.0 ,2.0 mmol/L MgCl₂) ,100 μ mol/L dNTPs ,0.2 μ mol/L 寡核苷酸 ISSR 引物(加拿大 British Columbia 大学) ,1 U Taq DNA 聚合酶(上海生工生物工程技术有限公司) ,50 ng 模板 DNA^[13]。扩增反应程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min ,接着 45 个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s ,48 ~ 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min ,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min(1 个循环) 。在 100 条引物中 11 条(表 2)可产生稳定重复的条带。

1.5 PCR 扩增产物的电泳

PCR 扩增产物的电泳参照文献[18]。

1.6 数据处理

由 RAPD-PCR 及 ISSR-PCR 图谱中统计出共有带和特征带后 ,可以通过以下公式计算出存在于类群间或类群内的多态性 :多态性(P)=(总带数 - 共有带数)/总带数^[20]。Shannon 多样性指数可以通过公式 $H = - \sum P_i \log_2 P_i$ (P_i 为位点 i 在群体中的出现频率)来计算^[21]。

表 2 ISSR-PCR 扩增反应中所筛选的引物序列、反应退火温度及在刀鲚各群体中的扩增条带数
 Tab.2 The sequence of primer chosen for ISSR-PCR, the annealing temperature in PCR reactions, and the amplified bands in the three populations of *Coilia ectenes*

引物	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	多态性条带数/总条带数		
			群体 1	群体 2	群体 3
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAYT	52	2/4	0/4	1/4
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	50	3/4	1/4	1/4
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTC	52	7/8	7/8	7/8
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	50	5/6	4/6	4/6
UBC899	CATGGTGTGGTTCATTGTCCA	50	7/10	7/10	7/10
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAYT	48	4/6	4/6	5/6
UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	52	2/5	1/5	3/6
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	48	4/6	6/6	4/6
UBC876	GATAGATAGACAGACA	50	5/5	3/5	3/5
UBC895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	50	3/7	2/7	3/7
UBC900	ACTTCCCACAGGTTAACACA	52	3/5	3/5	3/5
Total			45/66	38/66	41/67

注 :Y=(C/T),R=(A/G)

将出现的带记为 1,未出现的带记为 0,利用 RAPDistance 软件^[22]计算 Nei 遗传距离^[23]并生成遗传距离矩阵,利用 AMOVA 软件^[24]进行群体内、群体间的遗传分析,其中群体 1 和群体 2 因是同一年(2002 年)一个月时间内采集的样品,定为一组,旨在探明同一年内短时间内的样品有没有群体分化。而群体 3 因是 2003 年采集的,独立为另一组。同时,还利用 MEGA2 软件^[25]对 Nei 遗传距离进行 Neighbor-joining 聚类分析以及利用 Mantel 和 STATISTICA 软件对两种标记技术获得的结果进行相关性分析。

2 结果

2.1 刀鲚 DNA 的提取

通过 SDS 和蛋白酶 K 的消化,自刀鲚的肌肉组织中获得的 DNA,经电泳检测,其大小大于 23 kb,经紫外分光光度计检测,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7~2.0 范围内。说明提取的 DNA 是可以进行后续的工作。

2.2 RAPD-PCR 结果分析

利用 RAPD-PCR 分子标记技术,15 个随机引物在刀鲚 3 个群体中共检测到 110 条带,49% 以上的条带呈多态性(表 1 和图 1),其中群体 3 的多态性最高,达 0.657,同时该群体的 Shannon 多样性指数及 Nei 平均遗传距离也最大,分别为 22.38 及 0.145 4(表 3),说明相对群体 1 与群体 2 来说,该群体的个体之间遗传变异较大。群体 2 的多态性、Shannon 多样性指数及 Nei 平均遗传距离分别为 0.490、18.63 和 0.119 5,是这 3 个群体中最小的。

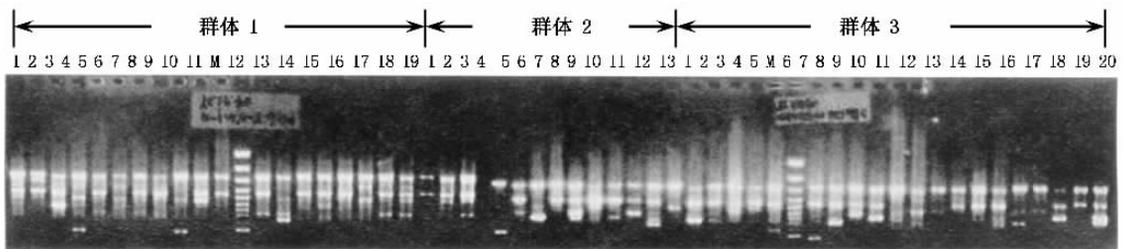


图 1 引物 P13 在 3 个群体中的 RAPD-PCR 扩增图谱

Fig.1 An example of RAPD-PCR pattern in *Coilia ectenes* amplified with primer P13
 图中的数字分别是不同群体的样品编号,M 是 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus

表 3 刀鲚三个群体的 Shannon 多样性指数、Nei 平均遗传距离及多态性

Tab.3 Shannon's index diversity, mean Nei's genetic distance and percentage of polymorphism in the three populations of *Coilia ectenes*

群体	香农多样性指数		Nei 遗传距离平均数 ± 标准误差		多态性百分数 (%)		平均每个引物出现的带数	
	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR
群体 1	20.44	13.66	0.130 9 ± 0.026 8	0.146 7 ± 0.038 2	58.25	68.18	6.87	6.00
群体 2	18.63	11.96	0.119 5 ± 0.028 5	0.129 6 ± 0.037 5	49.02	57.58	6.80	6.00
群体 3	22.38	11.56	0.145 4 ± 0.037 8	0.116 9 ± 0.032 0	65.74	61.19	7.20	6.09

刀鲚 3 个群体 RAPD 图谱的 AMOVA 分析结果(表 4)表明,按采样时间将这 3 个群体分成的两年之间的遗传变异占总方差的 -3.35%,但是这种差异极端不显著($P = 0.6693$),而群体内各个体之间的遗传变异是总变异的主要组成部分,占 96.35% 结果极端显著($P < 0.0001$)

表 4 刀鲚 3 个群体 52 个样品 RAPD-PCR 及 ISSR-PCR 图谱的 AMOVA 分析结果

Tab.4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for 52 individuals sampled from the three populations of *Coilia ectenes* using RAPD-PCR 110 and 67 ISSR-PCR bands

变异来源	自由度	离差平方和	均离差平方	方差组分	占总方差的百分数 %	ϕ 统计	P-值
RAPD-PCR							
年间	1	0.100 3	0.100	-0.002 3	-3.35	$\phi_{CT} = -0.033$	0.669 3
年内群体间	1	0.141 8	0.142	0.004 9	6.99	$\phi_{SC} = 0.068$	<0.000 1
群体内个体间	49	3.276 1	0.067	0.066 9	96.35	$\phi_{ST} = 0.036$	<0.000 1
总计	51	3.518 2					
ISSR-PCR							
年间	1	0.118 9	0.119	0.000 75	1.10	$\phi_{CT} = 0.011$	<0.000 1
年内群体间	1	0.094 4	0.094	0.001 87	2.75	$\phi_{SC} = 0.028$	0.104 4
群体内个体间	49	3.208 7	0.065	0.065 48	96.15	$\phi_{ST} = 0.039$	<0.000 1
总计	51	3.422 0					

2.3 ISSR-PCR 结果分析

在刀鲚 3 个群体的 ISSR-PCR 扩增图谱中(图 2),11 个引物共出现 67 条带(表 2)。与 RAPD 结果一致,群体 3 也是出现条带最多的,共 67 条。平均每个引物出现的带数比 RAPD-PCR 扩增图谱略少(表 3)。其中群体的多态性百分数、Shannon 多样性指数及平均 Nei 遗传距离以群体 1 为最大,分别为 0.682、13.66 和 0.1467,而群体 3 最小。同时,ISSR-PCR 图谱的 AMOVA 分析结果与 RAPD-PCR 的也一致(表 4),即按采样时间将这 3 个群体划分成的两年之间的遗传变异只占总变异的 1.1% ($P < 0.0001$),而群体内各个体之间的遗传变异是群体变异的主要组成部分,占总变异的 96.15% ($P < 0.0001$)。

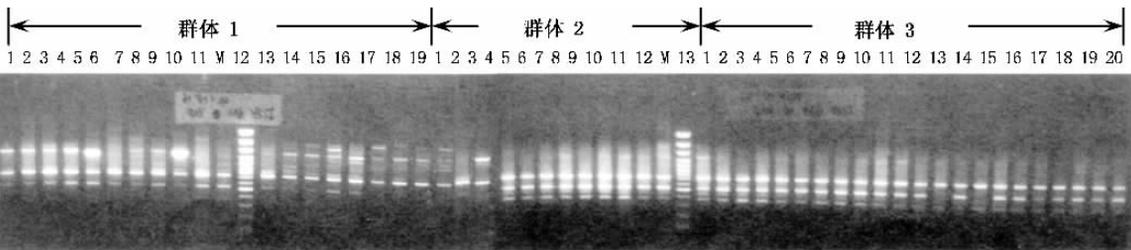


图 2 引物 UBC900 在 3 个群体中的 ISSR-PCR 扩增图谱

Fig.2 An example of ISSR-PCR pattern in *Coilia ectenes* amplified with primer UBC900

图中的数字分别是不同群体的样品编号, M 是 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus

2.4 刀鲚 3 个群体的聚类分析

在获得 3 个群体 52 个样品的 Nei 遗传距离后,我们利用 MEGA2 程序对其进行 Neighbor-joining 的聚类分析,结果见图 3。Mantel 检测结果表明 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 产生样品之间的 Nei 遗传距离很不一致($r = 0.119$, $g = 1.549 < g_{0.05}$) ,但聚类图显示出 3 个群体不同样品之间并不能按采集的时间分别聚集在同一个支序中,尽管在 ISSR-PCR 结果中有明显的群体遗传分化迹象,但与在同一时间内所采集的样品群体并不吻合(图 3)。在 AMOVA 分析结果的基础上,聚类图再次清楚地显示了刀鲚 3 个群体内各样品之间的遗传变异较大,不仅两年之间采集的样品没有明显的群体分化,同一年一个月内两次采集的各群体之间也没有明显的群体分化。

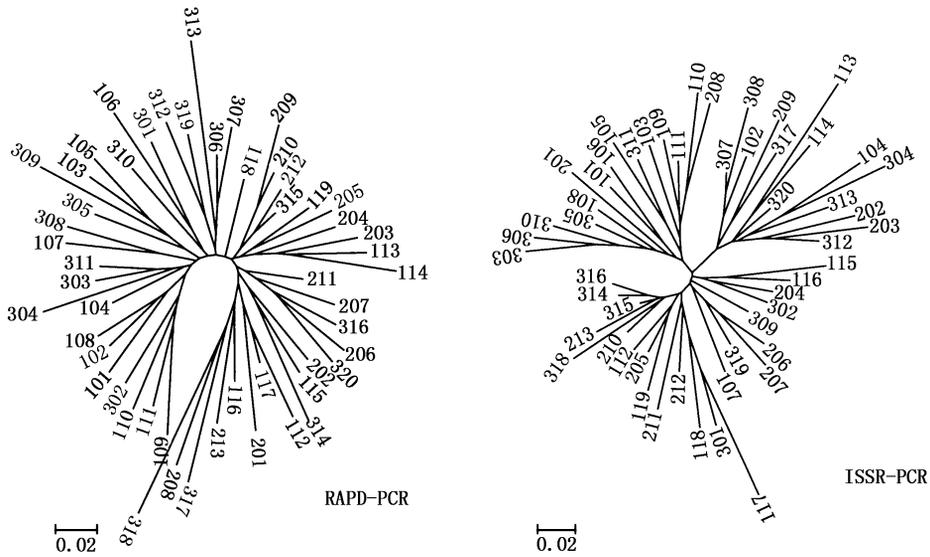


图 3 基于 Nei 遗传距离的刀鲚 3 个群体 Neighbor-joining 聚类图

Fig.3 Dendrogram of the three *Coilia ectenes* populations constructed using Neighbor-joining method based on matrices of pairwise Nei's genetic distances
每个样品的第一位数字代表所属群体,后面的两位数字是样品的系列编号

3 讨论

3.1 刀鲚的种群遗传结构及遗传变异分析

在利用 RAPD-PCR 和 ISSR-PCR 标记技术对 2002 年及 2003 年 3 次采集的 52 个刀鲚样品的遗传多样性与遗传变异分析后,可知这 3 个群体的多态性平均为 0.577(RAPD-PCR)或 0.623(ISSR-PCR),与已报道利用 RAPD-PCR 分析的结果非常一致^[6]。在洄游性鱼类中,刀鲚与东方鲀属(*Fugu* spp.)的多态性(0.567)^[26]相近,但比中华鲟(*Acipenser sinensis*)的多态性(0.430)^[27]高得多。AMOVA 和聚类分析结果(表 4 与图 3)同时说明同一年内群体之间没有明显的遗传分化(占总变异的 2.75% ~ 6.99%)及在聚类图中不能对应相应的支序,两年之间的样品群体分化也不明显(占总变异的 -3.35% ~ 1.1%) ,3 个群体的遗传变异极度显著地来自群体内个体之间(占总变异的 96%) ,52 个样品并非按采集时间的群体分布于聚类图中的各支序中。我们认为这可能主要由刀鲚的生活及繁殖方式所决定的。

刀鲚系洄游性鱼类,每年春、夏季由海入江河作生殖洄游,在长江上游干支流或湖泊的缓流区产卵。由于产卵地点的选择余地相对较少,使得在一定范围内不同地理群体的刀鲚可能同一地点或相对较近的区域产卵和受精,增加了群体外交配的可能性。这种生活及繁殖方式增加了长江口刀鲚各群体之间的基因交流机会,导致了一次所采集到的群体内各样品之间存在着较大的遗传变异,而在相对不太长

的时间内(如本文中的两年)所采集到的群体遗传分化程度相对较小。因生活及繁殖方式所增加的基因交流机会,也导致刀鲚遗传多样性维持在一定的高水平。

由于缺乏对刀鲚以前种群遗传结构分析的资料,目前还很难判断刀鲚种质资源因自然环境及过度捕捞等压力而遭到破坏的程度,但这些压力肯定对刀鲚的繁殖及迁徙不利,从而影响种群的遗传结构以降低其遗传多样性。我们也相信,若尽快减轻这些压力,对刀鲚的渔业资源乃至种质资源的恢复与保护都是很有利的。

3.2 RAPD-PCR 和 ISSR-PCR 标记技术的比较分析

利用 RAPD-PCR 及 ISSR-PCR 两种标记技术获得刀鲚群体的多态性、平均 N_{ei} 遗传距离、Shannon 多样性指数等结果,尽管局部分析相关性不是很明显,但从整体来说,通过 STATISTICA 软件分析可知,呈显著正相关($r = 0.95, P < 0.05$)。AMOVA 结果也显示利用这两种标记技术证明群体内各个体之间的遗传变异占总变异的 96% 以上。这些都体现出两种技术所获得的主要结果是相对一致的。

Mantel 检测结果表明刀鲚 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 产生各样品之间的 N_{ei} 遗传距离很不一致,聚类分析也支持这一判断(图 3),只有群体 2 内各个体之间的 N_{ei} 遗传距离表现出一定的正相关性($r = 0.373, g = 1.955 > g_{0.05}$)。在其它生物体例如水稻的研究中,钱韦等^[9]发现,在海南与云南两地具有长期地理隔离的地方采集的样品,两种技术结果的聚类分析极度正相关($r = 0.917, g = 12.789 > g_{0.01}$),但在各地区内,群体的遗传分化程度小,两种技术的聚类分析结果难以呈正相关($r < 0.20$)。Mattioni 等^[28]也在智利产的假山毛榉属(*Nothofagus*)研究中证实 3 个不同种间 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 技术结果的聚类分析极度正相关,但在种内不同群体之间的聚类分析存在着不同的结果。本文中,我们采集的样品都来自于长江口,正如上述分析的那样,群体的遗传分化不明显,以至两种技术结果的聚类分析难以吻合。在这种情况下如果增加 RAPD-PCR 与 ISSR-PCR 标记的数量,则有可能在这两种技术之间获得比较一致的结果^[9]。我们推测如果采集的样品分别来自不同的出海口,因长期的地理隔离等因素产生了一定的群体分化,两种技术结果的聚类分析也可能一致,有关这方面的分析有待于进一步完善。

ISSR-PCR 技术是在 SSR 的 3' 端或 5' 端锚定 1~4 个简并碱基,使基因组上只有那些与锚定的核苷酸匹配的位点才能被靶定,避免了 SSR 在基因组的滑动,从而大大提高了 PCR 扩增的专一性^[7,8]。所以在群体 1 和群体 2 中,利用 ISSR-PCR 标记技术检测到的多态性比 RAPD-PCR 的高(表 3)。利用 ISSR-PCR 标记技术获得的 3 个群体多态性平均值为 0.6232,比利用 RAPD-PCR 技术所获结果高约 5%,这点在其它物种的研究中也得到证实^[8,9,28]。这也是 ISSR-PCR 标记技术在物种遗传多样性、群体遗传学等方面更具有潜在研究价值的一个主要原因。在平均每个引物出现的带数中,我们发现 ISSR-PCR 比 RAPD-PCR 标记技术的少(表 3),是由于我们只利用琼脂糖凝胶电泳来分析结果,若改用聚丙烯酰胺凝胶电泳,因它的分辨率较高,估计出现的条带一定比目前的结果更理想。这也是我们的工作需要进一步完善的地方。

参考文献:

- [1] 高成洪. 长江刀鱼资源亟待保护[J]. 中国水产, 2000(3): 16-17.
- [2] 施德龙, 龚洪新. 关于保护长江口刀鲚资源的建议[J]. 海洋渔业, 2003, 25(2): 96-97.
- [3] 黄晋彪, 张雪生. 长江口刀鲚资源试析[J]. 水产科技情报, 1989, 16(6): 173-175.
- [4] 陈渊泉, 龚群, 黄卫平, 等. 长江河口区渔业资源特点、渔业现状及其合理利用的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 22(5): 48-51.
- [5] 刘文斌. 中国鲚属 4 种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26: 558-564.
- [6] 马春艳, 刘敏, 马凌波, 等. 长江口刀鲚遗传多样性的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 19-24.
- [7] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting simple sequence repeat (SSR) anchors polymerase chain reaction amplification[J]. Genome, 1994, 20: 178-183.
- [8] Qian W, Ge S, Hong D-Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 440-449.
- [9] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42: 741-750.

- [10] Fernandez M E , Figueiras A M , Benito C . The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism , genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin[J] . *Theor Appl Genet* , 2002 , 104 : 845 – 851 .
- [11] Culley T M , Wolfe A D . Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (*Violaceae*) , as indicated by allozyme and ISSR molecular markers[J] . *Heredity* , 2001 , 86 : 545 – 556 .
- [12] Iruela M , Rubio J , Cubero J I , *et al.* Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers[J] . *Theor Appl Genet* , 2002 , 104 : 643 – 651 .
- [13] 王伟继 , 孔 杰 . ISSR-PCR 技术在对虾中的应用初步研究 [J] . *海洋水产研究* , 2002 , 23 (1) : 1 – 4 .
- [14] 侯 林 , 曲若竹 , 邹向阳 , 等 . 中国 4 个两性生殖卤虫品系的 ISSR 指纹分析 [J] . *辽宁师范大学学报(自然科学版)* , 2003 , 26 : 174 – 177 .
- [15] 吕林兰 , 王爱民 , 杜晓东 , 等 . 马氏珠母贝 DNA 快速一步法(ROSE) 提取及 ISSR-PCR 应用 [J] . *海洋科学* , 2003 , 27 (10) : 42 – 45 .
- [16] 陈大鹏 , 沈怀舜 , 丁亚平 , 等 . 文蛤(*Meretrix meretrix*) 地理种群 ISSR 分子标记的初步研究 [J] . *南京师大学报(自然科学版)* , 2004 , 27 (3) : 74 – 77 .
- [17] 马俊芬 , 包振民 , 刘广绪 , 等 . 扇贝种间单对杂交一代幼虫 ISSR 标记的分离方式 [J] . *高技术通讯* , 2004 (5) : 82 – 87 .
- [18] Sambrook J , Russell D W . *Molecular Cloning : A Laboratory Manua* [M] . 3rd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 21 , 2001 .
- [19] 宋林生 , 刘保忠 , 相建海 . 海洋生物资源遗传多样性检测技术 [A] . 曾呈奎 , 相建海 . 海洋生物技术 [C] . 济南 : 山东科学技术出版社 , 1998 . 199 – 237 .
- [20] 邹喻苹 , 葛 颂 , 王晓东 . 系统与进化植物学中的分子标记 [M] . 北京 : 北京科学出版社 , 2001 .
- [21] Weising K , Nybom H , Wolff K , *et al.* *DNA Fingerprinting in Plants and Fung* [M] . Boca Raton : CRC Press , Inc . , 1995 .
- [22] Armstrong J , Gibbs A , Peakall R , *et al.* The RAPDistance Packag[Z] . <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html> , 1994 .
- [23] Nei M , Li W H . Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1979 , 76 : 5269 – 5273 .
- [24] Excoffier L , Smouse P E , Quattro J M . Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data [J] . *Genetics* , 1992 , 131 : 479 – 491 .
- [25] Kumar S , Tamura K , Jakobsen I B , *et al.* MEGA2 : molecular evolutionary genetics analysis software [J] . *Bioinformatics* , 2001 , 17 : 1244 – 1245 .
- [26] 陈 超 , 石 拓 , 孙曙光 , 等 . 应用 RAPD 标记对东方鲀属进行种类鉴别及其聚类分析 [J] . *海洋水产研究* , 2001 , 22 (3) : 32 – 36 .
- [27] 张四明 , 邓 怀 , 晏 勇 , 等 . 中华鲟随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究 [J] . *海洋与湖沼* , 2000 , 31 : 1 – 7 .
- [28] Mattioni C , Casasoli M , Gonzalez M , *et al.* Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species [J] . *Theor Appl Genet* , 2002 , 104 : 1064 – 1070 .