

大仓鼠年龄组及性别群体的遗传多样性

汪永庆 张知彬* 徐来祥

(中国科学院动物研究所, 北京, 100080)

摘要: 本文应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 采用多态位点率、Shannon 信息多样性指数和 Nei 遗传多样性指数作为种群遗传变异的指标, 研究了 1998 和 1999 年大仓鼠种群性别群体和年龄组群体的遗传多样性。主要的结论是: 性别群体间遗传分化较小, 年龄组群体间分化较大; 年龄组相距越大, 遗传分化也就越大; 幼年组的遗传多样性高于老龄组的遗传多样性; 1999 年秋季种群的年龄组遗传分化和差异要比 1998 年四季种群更为明显。大仓鼠不同年龄组群体间的遗传分化支持遗传结构由于受时空上的选择压力而产生变异和适应性观点。大仓鼠幼体的遗传多样性比成体和老体的较高, 这一结果倾向于支持 Ford 的假说, 说明种群繁殖出的幼体遗传多样性高, 其中有遗传质量好的, 也有遗传质量差的, 但在生存过程中, 随着选择压力的作用, 种群趋于适应, 与环境不相适应的类型遭到淘汰, 低质的幼体由于自然选择压力的增加而从种群中消失, 致使成年和老年群体多态性逐渐降低。

关键词: 大仓鼠; 遗传多样性; 种群动态; 遗传距离; 生态适应; 随机扩增多态性 DNA

中图分类号: Q346; Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 1050 (2002) 03 - 0187 - 14

遗传多样性主要是指种内不同群体和个体间的遗传多态性程度^[1]。种内的遗传变异或遗传多样性也是遗传学中所常称的多态性。遗传多样性可以表现在外部形态上、生理代谢上, 也可表现在染色体、DNA 分子等水平上^[2]。遗传多样性的根本来源可以归因于遗传物质的改变——突变和重组^[3,4]。

遗传变异普遍存在于许多物种内, 自然选择和遗传漂变能改变基因频率在时间和空间上的分布^[5]。遗传多态现象是起因于某种平衡选择, 还是起因于突变与选择之间、迁移与选择之间的平衡, 还是仅由 Castle - Hardy - Weinberg 平衡中的一系列中性基因造成的, 是目前种群遗传学研究的重要课题。维持平衡多态现象的机制之一是季节选择, 选择压力有规律性的、季节性的或周期性的变化能保持平衡多态现象^[2]。选择压力的暂时变化跟平衡多态现象有关^[6-8]。与密度有关的选择可以产生平衡多态现象^[2]。

有关种群遗传多样性的时间变异的研究主要是研究自然环境的变化与种群遗传多样性的关系^[9-13]。Nielsen 等研究了大麻哈鱼 (*Salmo salar*) 种群在长达 76 年间的遗传多样性的变化情况, 发现种群的遗传结构很稳定, 在时间序列上几乎没有遗传变异的改变^[10]。Coulson 等^[11]认为环境的异质性与遗传多样性有关, 并影响个体的适应, 而个体

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39730090); 中国科学院知识创新工程试点项目 (KSCX2 - 1 - 03, KSCX2 - SW - 103) 资助

作者简介: 汪永庆, 男, 博士, 主要从事分子生态学研究。

收稿日期: 2001 - 03 - 12; 修回日期: 2001 - 11 - 28

*通讯作者 E-mail: zhangzb@panda.ioz.ac.cn

适应能力的变化又导致自然种群的数量波动及种群遗传多样性的改变。他研究了从1982到1994年间马鹿 (*Cervus elaphus*) 种群的个体存活率、环境变化与13个基因位点的关系,发现适应性与基因型间有联系。

关于种群动态与遗传多样性的关系, Ford 提出在种群调节中遗传变异的重要意义(引自孙儒泳^[14])。他认为,当种群密度增加、死亡率降低时,自然选择的压力就比较松弛,因而,种群内的变异就有增加。其中有遗传质量好的,也有遗传质量差的,而且种群中遗传质量较差的个体也能存活下来。当条件恢复到正常的时候,死亡率增加了,于是这些低质的个体由于自然选择压力的增加而被淘汰掉,因而导致种群数量的下降。在种群数量下降的时候,种群内的变异型也就减少了。因此, Ford 认为,种群数量的增加,通过自然选择压力和遗传组成的改变,必然为种群数量的减少铺平了道路。但至今尚没有实验来检验该假说。

本文以小型哺乳动物——大仓鼠 (*Cricetulus triton*) 为对象,研究其年龄组和性别群体间遗传多样性的变异规律,目的在于检验 Ford 假说。根据 Ford 假说的预测,幼年年龄组的群体遗传多样性要高,随着年龄的增长并经过自然选择,遗传多样性逐渐降低,到老年时最低。雌、雄性别群体由于经历较为近似的自然选择,其遗传多样性的差异应该很小,可作为对照分析。

1 材料与方法

1.1 研究样品采集

大仓鼠是广布于我国北方平原、丘陵、山地等各类地形农区的一种重要害鼠,分布区从东部沿海省份向西,以浙江天目山为南限,包括黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、北京、天津、河北、河南、山东、山西、陕西、甘肃、宁夏、安徽、江苏等省市自治区,国外主要分布在朝鲜和俄罗斯的西伯利亚南部^[15]。大仓鼠划分为5个亚种,即指名亚种 (*C. t. triton*)、东北亚种 (*C. t. fuscipes*)、秦岭亚种 (*C. t. collinus*)、山西亚种 (*C. t. incanus*) 和甘肃亚种 (*C. t. canus*)。一般以体重作为划分年龄组的指标,划为6个年龄组。40.0 g 以下为幼年组,40.1 ~ 80.0 g 为亚成年组,80.1 ~ 120.0 g 为成年 I 组,120.1 ~ 160.0 g 为成年 II 组,160.1 ~ 200.0 g 为成年 III 组,200.1 g 以上为老年组^[16]。大仓鼠生态寿命为一年左右,繁殖期在3~8月份,一年繁殖1~3窝次,胎仔数2~22只,一般9~10只^[17]。本研究取样地区位于大仓鼠指名亚种的分布区,即华北平原。在1998年,选取河北省固安县取样,代表一个地方种群 (local population); 在1999年秋,在大仓鼠指名亚种的主分布区,选取5个地区取样,代表整个种群。

分别于1998年4月上旬,7月中旬,10月上旬和12月下旬在河北省固安县牛驼镇王龙村 (116.34E, 39.25N) 附近沿京开公路利用活捕笼在农田捕获大仓鼠,每次均在同一个2~3 km 的样线上平均取样,洞口布笼200~300个,连续3~7 d,为保证样本量,每季捕鼠大致在40~60只之间。没有河流等障碍阻隔样线上种群之间的基因交流。1998年共计捕获大仓鼠209只,其中春季60只,夏季45只,秋季59只,冬季45只; I 龄组57只, II 龄组73只, III 龄组59只, IV 龄组20只; 雌性个体91只,雄性个体118只。断头处死大仓鼠,取肝脏用于提取 DNA。

1999年9月20日至10月5日分别在北京市门头沟区齐家庄 (E115°51', N39°6')、顺义区城郊 (N40°14', E116°5')、河北省固安县牛驼乡 (N39°25', E116°34')、饶阳县五公乡 (N38°14', E115°9') 及河南省太康县城郊 (N34°7', E114°6') 5个地点利用活捕笼在农田捕获大仓鼠, 每次均在一个 2~3 km 的样线上均匀取样, 洞口布笼 200~300 个, 连续捕捉 3 d, 分别取样为 13、25、25、18、11 只, 共计 92 只, 其中 I, II, III, IV 组分别为 50, 27, 6, 9 只; 雌性占 51 只, 雄性占 42 只。

1.2 实验药品及仪器

1.2.1 生化试剂 DNA 提取缓冲液 [0.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 2 mmol/L EDTA (pH8.0), 1% SDS, 20 μg/ml 胰 RNA 酶], 蛋白酶 K, 6 mol/L NaCl 溶液 (饱和 NaCl 溶液), 异丙醇, 乙醇, TE 或灭菌 ddH₂O。Taq 酶、PCR 反应缓冲液购自中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, dNTP 购自 Promega 公司。RNase、溴化乙锭 (EB)、溴酚蓝电泳指示剂购自 Sigma 公司, DNA 分子量标准 DNA/EcoRI + HindIII、DNA 购自华美生物公司, 琼脂糖购自 GIBCO 公司。TAE 缓冲液 (0.04 mol/L Tris - 乙酸, 0.001 mol/L EDTA), 其它试剂均为国产分析纯。

1.2.2 随机引物 初步筛选引物时所用的随机引物来自 Operon 公司, 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 中的引物由赛百胜生物工程公司合成, PAGE 纯化。

1.2.3 主要实验仪器 高速台式冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)、TGL-16C 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)、QL-901 型旋涡混合器 (江苏海门其林医用仪器厂)、9600 型 PCR 扩增仪 (美国 PE 公司)、FPHC3HD 型 PCR 扩增仪 (英国 Techne 公司)、匀浆器 (日本日立公司)、2219 Multitemp II 型水浴锅 (LKB 公司)、3000 Xi 电泳仪 (英国 Bio-Rad 公司)、DYY33B 型水平电泳槽 (北京六一仪器厂)、DU7400 型紫外分光光度计 (BECKMAN 公司)、Eagle Eye - II 凝胶成像分析系统 (美国 Stratagene 公司)、UV-VI 型紫外透射分析仪 (北京智源通生物技术研究所)。

1.3 大仓鼠基因组 DNA 提取及质量检测

1.3.1 大仓鼠基因组 DNA 提取 参考 Salah 等的方法^[17], 略加改进。1) 取 50 mg 新鲜组织 (心、肝、脾、肾、肌肉) 放入 1.5 ml Eppendorf 管中, 加入 400 μl DNA 提取缓冲液, 用电动匀浆器快速匀浆 10~15 s。2) 加入 8 μl 20 mg/ml 蛋白酶 K (终浓度 400 μg/ml), 充分混匀后, 放入 55~65 °C 水浴锅中温浴 2 h。3) 加入 300 μl 6 mol/L NaCl, 在旋涡混合器上高速混合 30 s, 10 000 ×g 离心 30 min, 移上清液到另一离心管中。4) 加入等体积异丙醇, 混匀, 置 -20 °C 1 h, 然后 10 000 ×g 离心 15 min, 弃上清液。5) 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥后将其溶于适量灭菌水或 TE 中。采用本方法所提取的 DNA 无 RNA 污染, 且 DNA 没有降解, 通过紫外分光光度计检测 260 nm 和 280 nm 光吸收, 计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 值均在 1.75~1.80, DNA 产量约 500~700 ng/mg, 这足够进行几千次 PCR 反应。

1.3.2 DNA 质量检测 1) DNA 经稀释后在 Beckman DU7400 紫外分光光度计上测 260 nm 和 280 nm 的光吸收, 并计算 DNA 浓度。然后, 取 5 种组织 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测。2) RAPD-PCR 扩增。扩增在 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600 PCR 仪上进行, 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色后, 紫外分析仪上观察、照像。所提

DNA 放于 -70℃ 低温冰箱长期保存。

1.4 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 方法

1.4.1 引物筛选 本研究从 81 种 Operon 公司生产的引物中筛选出 7 种重复性好, 多态性高的引物用于大仓鼠种群遗传多样性的研究。将这 7 种引物在赛百盛生物工程公司合成并与 Operon 公司相同序列引物对照, 扩增结果一致 (表 1)。筛选时任选 5 个大仓鼠个体的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 选择那些在 5 个个体均能获得稳定重复扩增产物的引物, 用于大仓鼠种群的 RAPD 实验。对 1998 的实验材料, 仅用了 6 条引物 (未用 OPB05)。

表 1 所用随机引物及其序列

Table 1 Sequences of seven arbitrary primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence
OPA04	5' - AATCGGCTG - 3'
OPA09	5' - GTGATCCAG - 3'
OPA18	5' - AGGTGACCGT - 3'
OPB05	5' - TGCCGCCCTC - 3'
OPH14	5' - ACCAGGTTGG - 3'
OPM06	5' - CTGGGCAACT - 3'
OPY04	5' - GGCTGCAATG - 3'

1.4.2 检测 RAPD 反应条件 反应条件参考 Williams 等的方法^[18], 并略加改动。反应总体积为 25 μ l, 其中含 10 mmol/L Tris - HCl (pH8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂; 0.001 %明胶 (以上来自中国农业大学 RAPD 扩增反应 kit 的 10 倍缓冲液); 4 种 dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 各 100 μ mol/L; 随机引物 15 ng; 基因组 DNA 约 30 ng; Taq 酶 1.25 U; 加入一层石蜡油。PCR 扩增用美国 PE 公司 9600 型扩增仪。RAPD 反应条件为 94℃ (C 预变性 5 min, 随后进行 40 个循环。每个循环由 94℃, 1 min; 36℃, 1 min; 72℃, 2 min 组成。最后一个循环结束后在 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 4℃ 保存。扩增产物用含有 0.05 %溴化乙锭的 1.4 %琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA/EcoR I + Hind III 作为分子量标准。电泳电压 50V, 3 h, 紫外灯下观察并拍照。对大仓鼠 5 种组织进行了 RAPD 图谱检验, 各组织均扩增出清晰、一致的谱带, 说明本方法稳定可靠。

1.5 结果记录和分析

1.5.1 RAPD 谱带的记录 电泳图谱中的每一条带代表了模板与引物互补的一对结合位点, 记录时只记录那些谱带清晰, 并能在重复实验中稳定出现的条带。根据分子量标记的迁移率及带的有无, 统计所记录位点的分子量及条带的出现与否, 有带的记为 1, 无带的记为 0。用多态位点比率、Nei 指数^[19]和 Shannon 多样性指数^[20]来反映种群的遗传多样性。

1.5.2 多态位点比率 所谓多态位点是指其绝大多数等位基因的频率小于或等于 0.99 的位点。多态位点比率是指其等位基因的频率小于或等于 0.99 的位点所占的比率^[2]。本文用 Kongkiatngam 等的方法估测 RAPD 位点上的显、隐性等位基因频率^[21]。假定一个多态 RAPD 位点上有两个等位基因, 根据 Hardy - Weinberg 定律, RAPD 隐性等位基因的频率可由缺少这条带的个体频率开平方获得, 1 减去隐性等位基因的频率可得显性等位基因频率, 由这些等位基因的频率应用 Nei 指数和 Shannon 多样性指数计算种群的遗传多样性。

1.5.3 Nei 指数 Nei^[19]将总群体的基因多样性 (H_T) 分解为种群内基因多样性 (H_S) 和种群间基因多样性 (D_{ST}):

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

$$H_s = 1 - J_s = 1 - (J_i) / S$$

其中 S 为种群的数目, J_s 为种群内的基因一致性, $J_s = (J_i) / S$, $J_i = (x_{ik}^2) / n$, 这里 J_i 是第 i 个种群内的基因一致性, x_{ik} 是第 i 个种群第 k 个等位基因的频率, n 为多态位点数。

$$H_T = 1 - J_T = 1 - (X_k^2) / n$$

这里, J_T 为总群体的基因一致性, $J_T = (X_k^2) / n$, $X_k = \sum w_i x_{ik}$, w_i 是第 i 种群的加权 ($\sum w_i = 1$)。

$$D_{ST} = H_T - H_s \text{ 或 } D_{ST} = (D_{ij}) / S^2$$

这里, $D_{ij} = (J_i + J_j) / 2 - J_{ij}$, 其中 J_{ij} 是第 i 个种群和第 j 个种群间的基因一致性: $J_{ij} = \sum X_{ik} X_{jk}$ 。遗传分化系数 (G_{ST}) 是种群间基因多样性 (D_{ST}) 与总群体基因多样性 (H_T) 的比值:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

1.5.4 Shannon 信息指数 $H = -\sum p_i \log_2 p_i$, 这里 p_i 是第 i 条扩增产物存在的频率, 或称所谓的 RAPD 表型频率, H 则称为表型多样性指数。 H 可以计算两种水平的多样性: H_{POP} 和 H_{SP} 。 H_{POP} 是种群内平均多样性的测度, H_{SP} 是种内多样性。 H_{POP} / H_{SP} 是种群内多样性所占的比例, 种群间多样性所占比例为 $(H_{SP} - H_{POP}) / H_{SP}$ 。由于 Shannon 表型多样性指数只强调一条扩增带的有无, 所以它对处理 RAPD 数据是很适宜的。Lewontin^[20] 最早将 Shannon 信息指数用于人类遗传多样性的研究。King 等^[23] 用 Shannon 指数检测核糖体 DNA 限制性位点的变异。Chalmer 等^[24] 则发展了这个方法, 将它用于处理 RAPD 数据的统计工作中。本文根据 Kongkiatngam 等^[21] 的方法估测出 RAPD 位点上的显、隐性等位基因频率, 由这些等位基因的频率应用 Shannon 信息指数计算基因多样性, 即式中的 p_i 不是 RAPD 表型频率而是 i^{th} 等位基因的频率。

1.5.5 种群间的遗传距离 Nei^[3] 定义遗传距离为:

$$D = -\log_e I \text{ 或 } D = -\ln(I)$$

这里, $I = J_{xy} / (J_x J_y)$, 其中 J_x , J_y 和 J_{xy} 分别是所有位点上 j_x , j_y 和 j_{xy} 的算术平均数。 $j_x = \sum x_i^2$, $j_{xy} = \sum x_i y_i$, 其中 x_i 、 y_i 分别是 x 、 y 种群中第 i 个等位基因的频率。Nei (1978) 讨论了由少量取样个体估计平均杂合度和遗传距离的系统偏值, 认为如果研究了大量的位点, 且平均杂合度低, 那么用于估计平均杂合度的个体数量可以很少; 若是遗传距离大, 且两个种的平均杂合度低, 那么也可用很少的个体估测遗传距离。这就为某些情况下的少量取样提供了方便。

1.5.6 数据分析 统计各引物检测各种群的多态位点比率, 并根据 Kongkiatngam 等^[21] 的建议估计等位基因的频率, 应用 Nei 指数和 Shannon 信息指数计算种群的遗传多样性及种群间的遗传距离。使用 SPSS For Windows Version 8.0 软件作统计分析。用相关法检验遗传多样性指数与种群离边缘区距离的关系显著性。用 Chi - Square 检验或 Fisher 精确检验比较多态位点率以及两个基因频率之间差异的显著性。根据种群间的遗传距离, 利用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包^[25], 采用无权重配对算术平均数法 (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean, UPGMA) 对种群之间的关系

进行聚类分析。

2 结果

2.1 1998 年种群的遗传多样性

2.1.1 不同性别的遗传多态性差异 为了分析不同性别大仓鼠的遗传多态的情况, 把 1998 年 4 个季节的样本分为雌雄两组, 计算它们的多态位点比率, 用 Nei 指数和 Shannon 信息多样性指数计算群体的基因多样性和群体间遗传分化, 以比较不同性别的遗传多态的差异。

由表 2 可知, 大仓鼠不同性别种群的多态位点数、多态位点比率相差不大, 多态位点比率雄性为 81.4%, 雌性为 83.7%。经统计检验, 雌雄群体的多态位点率无明显差异 ($P = 0.467$)。

表 2 不同性别多态位点比率、Shannon 指数和 Nei 指数

Table 2 The polymorphic loci, Shannon index and Nei index detected with six primers for different gender populations of *Cricetulus triton*

指数 Index	雌性 Female	雄性 Male
多态位点比率 Polymorphic loci	0.837	0.814
Shannon 指数 Shannon index	7.779 \pm 2.820	7.439 \pm 2.418
Nei 指数 Nei index	0.273 \pm 0.053	0.266 \pm 0.052

根据 Kongkiatngam 等^[21]的方法估测了雌雄群体内各位点上等位基因的频率, 应用 Shannon 信息指数和 Nei 指数计算了大仓鼠雌雄种群的遗传变异。由 Shannon 信息指数计算的种群的遗传多样性为: 雄性 7.439 \pm 2.418, 雌性 7.779 \pm 2.820 (表 2), 群体内遗传多样性所占比例为 96.4%, 群体间遗传多样性所占比例为 3.6% (表 3)。

不同性别群体的 Nei 指数相近, 分别为: 雄性 0.273 \pm 0.053, 雌性 0.266 \pm 0.052 (表 2), 雄性略高于雌性。群体之间遗传分化为 0.032 \pm 0.009, 只有 3.2% 的变异存在于雌雄群体之间, 大部分的变异 (96.8%) 存在于群体之内 (表 3)。

表 3 由 Shannon 指数和 Nei 指数计算的大仓鼠性别群体间的遗传分化

Table 3 Partitioning of the genetic diversity between and within gender populations of *Cricetulus triton* with six primers calculated by Shannon index and Nei index

指数 Index	总群体的基因 多样性 ¹ H_{SP}	种群内的基因 多样性 ² H_{POP}	种群内遗传多样性 所占比率 ³ H_{POP}/H_{SP}	种群间遗传多样性所 占比率 ⁴ $(H_{SP} - H_{POP})/H_{SP}$
Shannon 指数 Shannon index	7.891 \pm 2.677	7.609 \pm 2.585	0.964 \pm 0.011	0.036 \pm 0.011
Nei 指数 Nei index	0.278 \pm 0.050	0.270 \pm 0.050	0.968 \pm 0.009	0.032 \pm 0.009

注 Note: 1: Genetic diversity of total population; 2: Genetic diversity within population; 3: Ratio of genetic diversity within population; 4: Ratio of genetic diversity among populations

2.1.2 不同年龄组之间的遗传变异 为了比较不同年龄组群体之间的遗传差异, 将 4 个季节的样本作为一个总体, 按体重组。统计这 4 个年龄组的多态位点数和多态位点比率, 并运用 Nei 指数和 Shannon 信息指数计算年龄组之间的遗传多样性、遗传分化和遗传距离。

由 7 个引物检测出的 4 个年龄组总的多态位点率中, 龄组的多态位点率最高, 龄组的多态位点率最低, 4 个年龄组多态位点比率从小到大排列顺序为 龄 < 龄 = 龄 < 龄 (表 4), 多态位点数也表现出相同的规律。但经统计检验, 不同年龄组多态位点率的差异不显著。

表 4 各引物检测大仓鼠季节种群不同年龄组总多态位点率、Shannon 指数和 Nei 指数

Table 4 Polymorphic loci, Shannon index and Nei index detected with six primers for four age populations of *Cricetulus triton* (Numbers in brackets are the proportion of polymorphic loci)

指数 Index	龄组 Age group	龄组 Age group	龄组 Age group	龄组 Age group
总多态位点率 Polymorphic loci	0.782	0.724	0.724	0.713
Shannon 指数 Shannon index	7.759 ±2.934	6.643 ±2.077	6.996 ±1.847	7.366 ±3.747
Nei 指数 Nei index	0.276 ±0.047	0.240 ±0.060	0.255 ±0.045	0.258 ±0.082

由 7 个引物扩增得到的 4 个季节种群不同年龄组的 Shannon 多样性指数从小到大排列有如下趋势: < < < , 此结论与由多态位点率得出的结论略有差异, 但 龄组的遗传多样性始终是最高的 (表 3)。由 Shannon 指数计算的大仓鼠季节种群不同年龄组内和年龄组间遗传多样性所占比例分别为 90.9% 和 9.1%, 遗传变异大部分存在于年龄组内部, 只有少数变异存在于年龄组之间 (表 5)。

用 Nei 指数计算大仓鼠季节种群各年龄组的遗传变异。由 Nei 指数计算的各年龄组基因多样性的平均值中, 龄组的基因多样性最高, 按基因多样性的大小排列各年龄组顺序为: < < < 。根据 Nei 指数计算的大仓鼠季节种群各年龄组的遗传分化为 0.077, 只有 7.7% 的变异存在于年龄组之间, 大部分的变异 (92.3%) 存在于年龄组之内 (表 5)。

表 5 由 Shannon 指数和 Nei 指数计算的大仓鼠季节种群不同年龄组间的遗传分化

Table 5 Partitioning of the genetic diversity between and within four age groups calculated by Shannon's index and Nei index

引物 Primer	总群体的基因多样性 ¹ H_{SP}	种群内的基因多样性 ² H_{POP}	种群内遗传多样性所占比率 ³ H_{POP}/H_{SP}	种群间遗传多样性所占比率 ⁴ $(H_{SP} - H_{POP})/H_{SP}$
Shanon 指数 Shanon Index	7.891 ±2.677	7.191 ±2.521	0.909 ±0.016	0.091 ±0.016
Nei 指数 Nei Index	0.276 ±0.047	0.257 ±0.050	0.923 ±0.018	0.077 ±0.018

注 Note: 1: Genetic diversity of total population; 2: Genetic diversity within population; 3: Ratio of genetic diversity within population; 4: Ratio of genetic diversity among populations

2.1.3 不同年龄组间遗传距离 利用估算的季节种群不同年龄组各位点上等位基因的频率, 根据 Nei 的方法^[19], 本文计算了大仓鼠季节种群年龄组之间的遗传距离 (表 6, 图 1)。各年龄组间的遗传距离从 0.008 2 到 0.023 7 不等, I 龄组和 II 龄组的遗传距离最小 (0.008 2), I 龄组和 IV 龄组之间的遗传距离最大 (0.023 7)。从各年龄组的 UPGMA 图可见, I 龄组和 II 龄组聚在一起, I 龄组和 IV 龄组聚在一起 (图 1)。

表 6 由 Nei 指数计算的大仓鼠不同年龄组间遗传距离

Table 6 Matrix of genetic distance of four age groups of *C. triton* calculated by Nei index

	龄组 Age group	龄组 Age group	龄组 Age group	龄组 Age group
龄组 Age group	0			
龄组 Age group	0.0136	0		
龄组 Age group	0.0194	0.0082	0	
龄组 Age group	0.0188	0.0232	0.0237	0

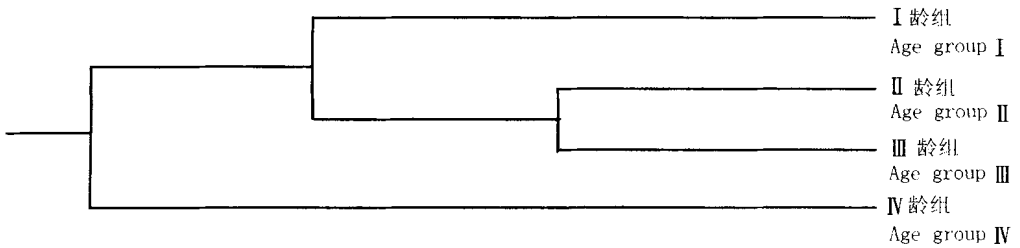


图 1 大仓鼠种群各年龄组 UPGMA 图

Fig. 1 UPGMA dendrograms of the genetic relationships among age groups of *Cricetulus triton* populations

2.2 1999 年种群的遗传多样性

2.2.1 性别群体的遗传多样性 对于地区样品, 我们同样将它们按性别分为雌雄两组, 计算出各自的多态位点率, 并用 Nei 指数和 Shannon 信息多样性指数计算群体的基因多样性和群体间的遗传分化, 以比较不同性别的遗传多态的差异。

由表 7 可知, 雌性多态位点比率 (93.7%) 大于雄性 (91.3%), 经统计检验, 雌雄群体多态位点率无明显差异 ($P = 0.798$)。

根据 Kongkiatngam 等的方法^[21] 估测了雌雄群体内各位点上等位基因的频率, 应用 Shannon 信息指数计算了大仓鼠雌雄群体的遗传变异。由 Shannon 信息指数计算的群体的遗传多样性为雄性 8.216 ± 1.489 , 雌性 7.651 ± 2.036 (表 7), 群体内遗传多样性所占比例为 93.6%, 群体间遗传多样性所占比例为 6.4% (表 8), 与 1998 年种群类似。

用 Nei 指数计算大仓鼠雌雄性别群体的遗传变异。不同性别群体的 Nei 指数相近, 分别为: 雄性 0.332 ± 0.064 , 雌性 0.301 ± 0.084 (表 7), 雄性略高于雌性。群体之间遗传分化为 0.058 ± 0.039 (表 8), 只有 5.8% 的变异存在于雌雄之间, 大部分的变异

(94.2%) 存在于群体之内。

表 7 由 Shannon 指数计算的大仓鼠不同性别群体间的基因多样性

Table 7 Genetic diversity of different gender of *Cricetulus triton* populations calculated by the polymorphic loci, Shannon index and Nei index

指数 Index	雌性 Female	雄性 Male
总多态位点率 Polymorphic loci	0.937	0.913
Shannon 指数 Shannon index	7.651 ±2.036	8.216 ±1.489
Nei 指数 Nei index	0.301 ±0.084	0.332 ±0.064

2.2.2 不同年龄组的遗传多样性 为了比较不同年龄组之间的遗传变异, 将 5 个地区的样本作为一个总体, 按体重分组。统计这 4 个年龄组的多态位点数和多态位点比率, 并运用 Nei 指数和 Shannon 信息指数计算年龄组之间的遗传多样性、遗传分化和遗传距离。

表 8 由 Shannon 指数计算的大仓鼠不同性别群体间的遗传分化

Table 8 Partitioning of the genetic diversity between and within gender populations of *Cricetulus triton* with seven primers calculated by Shannon index

指数 Index	总群体的基因 多样性 ¹ H_{SP}	种群内的基因 多样性 ² H_{POP}	种群内遗传多样性所占 比率 ³ H_{POP}/H_{SP}	种群间遗传多样性所 占比率 ⁴ $(H_{SP} - H_{POP})/H_{SP}$
Shannon 指数 Shannon index	8.492 ±1.755	7.933 ±1.609	0.936 ±0.041	0.064 ±0.041
Nei 指数 Nei index	0.336 ±0.065	0.317 ±0.068	0.952 ±0.039	0.058 ±0.039

注 Note: 1: Genetic diversity of total population; 2: Genetic diversity within population; 3: Ratio of genetic diversity within population; 4: Ratio of genetic diversity among populations

由 7 个引物检测出的总的多态位点率中, 龄组的多态位点率最高, 龄组的多态位点率最低, 4 个年龄组多态位点比率从小到大排列顺序为: 多态位点数从小到大排列顺序为: 龄 < 龄 < 龄 < 龄 (表 9)。经统计检验, 龄和 龄 ($P = 0.000$), 龄和 龄 ($P = 0.000$), 龄和 龄 ($P = 0.000$) 以及 龄和 龄 ($P = 0.000$) 之间多态位点率有极显著差异, 龄和 龄以及 龄和 龄差异不显著。

从 Shannon 多样性指数的平均值来看, 龄的遗传多样性最高, 龄的遗传多样性最低, 按从小到大排列如下: < < < , 此结论与由多态位点率得出的结论基本一致, 但 组最高。不同年龄组内和年龄组间遗传多样性所占比例分别为 74.8% 和 25.2%, 遗传变异大部分存在于年龄组内部, 只有少数变异存在于年龄组之间 (表 10)。

由 Nei 指数计算的各年龄组基因多样性的平均值中, 龄组的基因多样性最高 (0.324) 见表 9, 按基因多样性的大小排列各年龄组顺序为: < < < 。根据 Nei 指数计算的大仓鼠地区种群各年龄组的遗传分化为 0.239, 表明有 23.9% 的变异存在于年龄组之间, 大部分的变异 (76.1%) 存在于年龄组之内 (表 10)。

表9 各引物检测的大仓鼠不同年龄组群体间的遗传多样性

Table 9 Polymorphic loci, Shannon index and Nei index detected with seven primers for four age groups of *Cricetulus triton*

指数 Index	年龄组 Age group							
	I 龄组 Age group I		II 龄组 Age group II		III 龄组 Age group III		IV 龄组 Age group IV	
总多态位点率 Polymorphic loci	0.937		0.875		0.560		0.571	
Shannon 指数 Shannon index	7.407 ±2.039		7.765 ±1.702		5.097 ±1.908		4.555 ±2.602	
Nei 指数 Nei index	0.324 ±0.062		0.314 ±0.073		0.217 ±0.097		0.183 ±0.113	

表10 由 Shannon 指数和 Nei 指数计算的大仓鼠不同年龄组群体间的遗传分化

Table 10 Genetic differentiation among four age groups of *Cricetulus triton* calculated by Shannon index and Nei index

引物 Primer	总群体的基因 多样性 ¹ H_{SP}	种群内的基因 多样性 ² H_{POP}	种群内遗传多样性所 占比率 ³ H_{POP}/H_{SP}	种群间遗传多样性所 占比率 ⁴ $(H_{SP} - H_{POP})/H_{SP}$
Shannon 指数 Shannon index	8.492 ±1.755	6.365 ±1.704	0.748 ±0.092	0.252 ±0.092
Nei 指数 Nei index	0.336 ±0.065	0.259 ±0.076	0.761 ±0.083	0.239 ±0.083

注 Note: 1: Genetic diversity of total population; 2: Genetic diversity within population; 3: Ratio of genetic diversity within population; 4: Ratio of genetic diversity among populations

2.2.3 不同年龄组的遗传距离 利用计算的 1999 年种群的不同年龄组各位点上等位基因的频率, 根据 Nei 的方法^[19], 本文计算了大仓鼠年龄组之间的遗传距离 (表 11)。各年龄组间的遗传距离位于 0.025 3 ~ 0.104 1 之间, I 龄组和 II 龄组的遗传距离最小 (0.025 3), I 龄组和 III 龄组之间的遗传距离最大 (0.104 1)。从各年龄组的 UPGMA 图可见, I 龄组和 II 龄组聚在一起, II 龄组和 III 龄组聚在一起 (图 2)。

表11 由 Nei 指数计算的大仓鼠不同年龄组群体间的遗传距离

Table 11 Matrix of genetic distance of four age groups of *Cricetulus triton* calculated by Nei's index

	I 龄组 Age group I	II 龄组 Age group II	III 龄组 Age group III	IV 龄组 Age group IV
I 龄组 Age group I	0			
II 龄组 Age group II	0.0253	0		
III 龄组 Age group III	0.0564	0.0516	0	
IV 龄组 Age group IV	0.0814	0.0583	0.1041	0

3 讨论

本研究通过对 1998 和 1999 年度大仓鼠种群遗传多样性的研究, 主要的结论是: 性别群体间遗传分化较小, 年龄组群体间分化较大; 年龄组相距越大, 遗传分化也就越大; 幼年组的遗传多样性高于老龄组的遗传多样性; 1999 年秋季地区种群的年龄组遗

传分化和差异要比 1998 年四季种群更为明显。

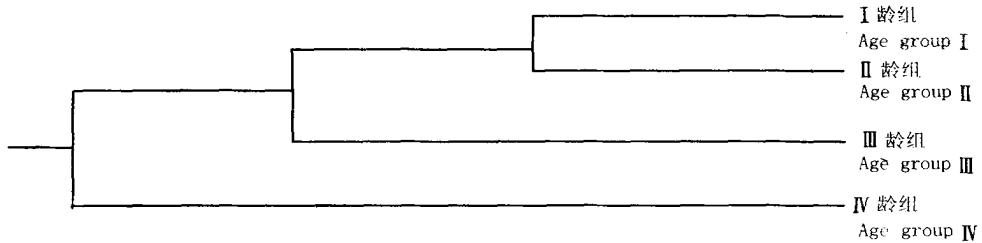


图 2 大仓鼠地区种群不同年龄组的 UPGMA 图

Fig. 2 UPGMA dendrograms of the genetic relationships among age groups of geographic populations of *Cricetus triton*

性别群体间遗传分化较小，是因为这 2 个群体都生存在相同的环境中，具有相似的生活史，经历了相似的选择压力。年龄组群体间分化较大，且年龄组相距越大，遗传分化也就越大，说明，，组群体经历一定的选择压力，并随着时间的推移，年龄组群体间的遗传差异越来越大，这说明种群的遗传结构在较短的时间尺度上也会发生变化，这是过去的研究所忽视的。大仓鼠不同性别群体间及年龄组群体间的遗传分化支持遗传结构由于受时空上的选择压力而产生变异和适应性观点^[5]。

大仓鼠不同年龄组群体之间的 RAPD 位点多态率、Shannon 信息多样性指数和 Nei 遗传多样性指数有所不同，基本上表现为幼体的遗传多样性较高。这一结果支持 Ford 的假说，说明种群繁殖出的幼体遗传多样性高，其中有遗传质量好的，也有遗传质量差的，但在生存过程中，随着选择压力的作用，种群趋于适应，与环境不相适应的类型遭到淘汰，低质的幼体由于自然选择压力的增加而从种群中消失，致使成年和老年群体多态性逐渐降低。

值得注意的是，1999 年秋季种群年龄组群体间的遗传差异明显大于 1998 年的四季种群。这是因为大仓鼠的寿命一般为 1 年左右，1998 年春、夏取样个体中大部分是 1997 年越冬个体，而越冬个体的体重在冬季停止生长，故实际上，，组个体要比实际的年龄高，在一定程度上降低低龄组的遗传多样性。1999 年的取样是一个年龄横截面，而且秋季正是大量幼体出现的季节，与老龄个体对比更为明显。

由于 RAPD 技术特有的检测方式，以及高效、快速、简便的特点，使 RAPD 作为一种 DNA 分子标记技术，从技术建立至今仅十年的时间中，在动物、植物和微生物的遗传多样性检测，品系鉴定，医学诊断，基因定位，遗传标记，基因图谱构建和基因遗传作图，亲缘关系和系统进化的研究等方面得到广泛的应用^[26~37]。但是，RAPD 技术也有其局限性^[38~40]，主要是影响 RAPD 反应的因素很多，条件稍有变化，结果就不稳定，这使得实验结果的可靠性和重复性不易稳定。为此，本文对 RAPD 实验的可靠性和重复性问题进行重点研究，包括 PCR 反应体系中各种影响因素，如模板质量、模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物 G+C 含量、引物浓度、Taq DNA 酶用量及其纯度、PCR 仪的性能、循环次数、温度设置、凝胶电泳的类别和胶的质量等，使实验具有很好的重复

性和稳定性。

由于 RAPD 标记具有显性特征, RAPD 谱带中一条扩增产物的存在并不能区别与之相关的位点是纯合的还是杂合的, 需要确定位点的杂合性时, 还必须借助另外的实验手段来检测。所以目前还无法从 RAPD 扩增谱带的频率直接得出基因的频率。魏伟等^[29]分别应用表型频率和根据 Kongkiangam 等的方法^[21]估算的等位基因频率计算了 Shannon 表型多样性指数和 Nei 基因多样性指数, 认为根据 Kongkiatngam 等的方法^[21]估算的等位基因频率统计的多样性指数比用表型频率计算的遗传多样性合理。本文也根据 Kongkiangam 等的方法^[21], 先估算出大仓鼠各位点上的等位基因频率, 再分别应用 Shannon 信息指数和 Nei 指数计算种群的遗传多样性。

参考文献:

- [1] 施立明, 宿兵, 张亚平. 概论 [A]. 见: 季维智, 宿兵主编. 遗传多样性研究的原理与方法 [C]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- [2] Merrell D J (黄瑞复, 魏蓉城, 晏一祥译). 生态遗传学 [M]. 北京: 科学出版社. 1991. 1 - 480.
- [3] Ayala F J, Kiger J A. Modern Genetics (2nd ed.) [M]. Menlo Park: Benjamin - Cummings, 1984.
- [4] Grant V. The Evolutionary Process: A Critical Study of Evolutionary Theory. (2nd ed.) [M]. New York: Columbia University Press. 1991.
- [5] Endler J A. Genetic heterogeneity and ecology [A]. In: Berry R J eds. Genes in Ecology (first published in 1992) [C]. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- [6] Hedrick P W. Genetic variation in a heterogeneous environment I. Temporal heterogeneity and the absolute dominance model [J]. *Genetics*, 1974, 78: 757 - 770.
- [7] Gillespie J H. The role of migration in the genetic structure of populations in temporally and spatially varying environments I. Conditions for polymorphism [J]. *Amer Nat*, 1975, 109: 127 - 135.
- [8] Høekstra R F. A deterministic model of cyclical selection [J]. *Genet Res*, 1975, 25: 1 - 15.
- [9] Nielsen E E, Hansen M M, Loeschcke V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years [J]. *Molecular Ecology*, 1997, 6: 487 - 492.
- [10] Nielsen E E, Hansen M M, Loeschcke V. Genetic variation in time and space: Microsatellite analysis of extinct and extant populations of Atlantic salmon [J]. *Evolution*, 1999, 53: 261 - 268.
- [11] Coulson T N, Albon S D, Pemberton J M. Genotype by environment interactions in winter survival in red deer [J]. *Journal of Animal Ecology*, 1998, 67: 434 - 445.
- [12] Rodriguez-Trelles F, Alvarez G, Zapata C. Time-series analysis of seasonal changes of the inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* [J]. 1996, 142: 179 - 187.
- [13] Schaal B A, Leverich W J, Rogstad S H. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology [A]. In: Falk D A, Holsinger K E eds. Genetics and Conservation of Rare Plants [C]. New York: Oxford University Press, 1991. 123 - 134.
- [14] 孙儒泳. 动物生态学原理 (第二版) [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 314 - 316.
- [15] 杨荷芳, 王淑卿, 郝守身, 曹小平, 王福生, 许同钦. 大仓鼠种群繁殖特征及其在种群调节中的作用 [J]. 动物学集刊, 1992, 9: 61 - 80.
- [16] 张知彬, 王祖望. 农业重要害鼠的生态学及控制对策 [M]. 北京: 海洋出版社, 1998. 5 - 6
- [17] Salah M A, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4692 - 4693.
- [18] Williams J G K, Kubeik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531 - 6535.

- [19] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 3321 - 3323.
- [20] Lewontin R C. The apportionment of human diversity [J]. *Evol Biol*, 1972, 6: 381 - 398.
- [21] Kongkiatngam P, Waterway M J, Fortin M G, Coulman B E. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers [J]. *Euphytica*, 1995, 84: 237 - 246.
- [22] 马克平. 生物群落多样性的测度方法 [A]. 中国科学院生物多样性委员会主编, 生物多样性的原理与方法 [C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 141 - 165.
- [23] King L M, Schoaal B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* [J]. *Evolution*, 1989, 43: 1117 - 1119.
- [24] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, Simons A J, Powell W. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers [J]. *Heredity*, 1992, 69: 465 - 472.
- [25] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, ver 1. 01 [M]. University Park: The Pennsylvania State University, 1993.
- [26] 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法 [A]. 见: 中国科学院生物多样性委员会主编, 生物多样性研究的原理与方法 [C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [27] 宋林生, 相建海, 李晨曦. 用 RAPD 标记研究对虾属六个种间的亲缘关系 [J]. *动物学报*, 1998, 44 (3): 353 - 359.
- [28] 沈曦, 周开亚, 王义权. 中国蝮属蛇类的 RAPD 分析 [J]. *动物学报*, 1999, 45 (1): 40 - 48.
- [29] 魏伟, 王洪新, 胡志昂, 钟敏, 恽锐, 钱迎倩. 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: RAPD 证据 [J]. *生态学报*, 1999, 19 (1): 16 - 22.
- [30] 孙致良, 张超良, 金德敏. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系研究中的应用 [J]. *遗传学报*, 1999, 26 (1): 61 - 68.
- [31] 廖翔华, 伦照荣. 寄生在中国草鱼、鲤鱼和马口鱼的头槽绦虫的分类和亲缘关系 [J]. *科学通报*, 1998, 43 (10): 1073 - 1076.
- [32] 吕雪梅, 杨关福, 张细权. 蛋鸡品系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析 [J]. *遗传*, 1999, 21 (2): 24 - 28.
- [33] Bassam B J, Caetano-Anolles G. DNA amplification fingerprinting of bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotech*, 1992, 77: 321 - 341.
- [34] Bai D, Brandle J, Reeleder R. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis [J]. *Genome*, 1997, 40: 111 - 115.
- [35] Garner K J, Slavicek J M. Identification and characterization of a RAPD - PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths [J]. *Insect Molecular Biology*, 1996, 5: 81 - 91.
- [36] Sommerfeldt A D, Bishop J D D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals extensive natural chimerism in a marine protochordate [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 885 - 890.
- [37] Wilkie S E, Isaac P G, Slater R J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium* [J]. *TAG*, 1993, 86: 497 - 504.
- [38] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究 [J]. *动物学研究*, 1997, 18 (2): 221 - 227.
- [39] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 张志宪, 洪德元. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. *植物学报*, 1996, 38 (12): 954 - 962.
- [40] Lowe A J, Hancette O, Buarino L. A Standard molecular genetic technique used in identify of germplasm resource: random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Plant Genetic Newsletter*, 1996, 107: 50 - 54.

GENETIC DIVERSITY OF SEX AND AGE GROUP OF CRICETULUS TRITON POPULATION

WANG Yongqing ZHANG Zhibin XU Laixiang

(State Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Institute of Zoology,
the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Abstract: The genetic diversities of sex populations and age group populations of the Rat-like hamster (*Cricetulus triton*) populations in 1998 and 1999 were studied by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method through the polymerase chain reaction (PCR). The proportion of polymorphic loci, Shannon index and Nei's Index were used to describe the population genetic diversity. It was discovered that the genetic differentiation between male and female group populations was relatively small, while it was greater among four age group populations; the genetic distance increased with increase of age gap; the genetic diversity of juvenile group population was higher than that of older age group populations; the genetic differentiation and difference of autumn population in 1999 were more apparent than that of 4 season populations in 1998. The genetic differentiation among age group populations supported the view that genetic structure experienced change even under the selection in microtime scale. The higher genetic diversity in juvenile age group population supported the Ford hypothesis that the new born animals were genetically diversified, some with better qualities, and some with lower ones. However, under natural selection, the individuals with lower genetic qualities were eliminated. Thus, the juveniles with lower genetic qualities would be disappeared due to the increase in natural selection pressures, while the genetic diversities of adult or old individuals were gradually reduced.

Key words: Rat-like hamster (*Cricetulus triton*); Genetic diversity; Population dynamic; Genetic distance; Ecological adaptation; Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

《动物学研究》2003 年征订启事

动物学类和生物学类核心期刊

CN53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853

《动物学研究》创刊于 1980 年。是中国科学院昆明动物研究所主办的向国内外公开发行的学报级学术性期刊。主要刊登动物学领域各分支学科具有创新性的基础和应用基础研究报告; 结合本人研究工作, 反映国际最新研究水平的综述; 研究简报、快报、新书评介等。

2001 年入选中国期刊方阵双效期刊, 影响因子为 0.318。

本刊读者对象为科研机构、大专院校从事动物科学研究、教学和资源环境保护与管理的有关人员。也是从事生命科学、医学、农林牧渔等方面科研、教学和生产的有关人员的重要参考资料。

本刊为双月刊, 双月 22 日出版。大 16 开本, 每期 80 页。单价 10.00 元, 全年 60.00 元。国内邮发代号: 64 - 20, 全国各地邮局(所)均可订阅, 如错过订期也可汇款到本刊编辑部订阅。

编辑部地址: 昆明市教场东路 32 号 中国科学院昆明动物研究所 邮政编码: 650223

电话: (0871) 5199026 E-mail: zores@mail.kiz.ac.cn