

绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群的生化遗传变异及亲缘关系

马波, 陈金平, 董崇智

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:采用淀粉凝胶电泳方法,对由日本海溯河洄游到中国境内绥芬河的三块鱼(*Tribolodon brandti*)和珠星三块鱼(*T. hakonensis*)繁殖群体的生化遗传结构及变异进行比较研究。结果表明,在选取的12种同工酶中共检测出27个基因位点,三块鱼和珠星三块鱼的多态位点比例分别为22.22%和18.52%,平均杂合度分别为0.0670和0.0695;除了三块鱼的*Gpi-1*和珠星三块鱼的*Est*多态位点外,两种鱼的*Ldh-1*、 α -*Gpd-1*、*Sdh-1*、*Aat-1*及三块鱼的*Est*多态位点上的基因型分布都显著地偏离Hardy-Weinberg平衡,表现出杂合子明显缺失或过剩现象;三块鱼和珠星三块鱼种群间相同基因位点上的等位基因分布频率出现显著的分化,遗传相似度和遗传距离分别为0.6912和0.3693。结论认为,三块鱼和珠星三块鱼的遗传多样性已达到种的差异水平。

关键词:三块鱼;珠星三块鱼;同工酶;遗传变异;遗传距离

中图分类号:Q959.4;Q342 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)06-0688-06

三块鱼属(*Tribolodon*)的鱼类大多分布于亚洲东北部的中国、朝鲜、日本及俄罗斯等沿海区域,主要生活在河口及海湾近岸水域。三块鱼(*T. brandti*)和珠星三块鱼(*T. hakonensis*)是中国注入日本海的绥芬河和图们江水系所特有的三块鱼属中的两种经济鱼类,也是鲑科中唯一的溯河洄游性鱼类^[1]。目前,由于过度捕捞和环境的日趋恶化,三块鱼和珠星三块鱼资源量呈明显下降趋势,因此急需采取措施以保护其渔业资源。国内对其繁殖生物学^[2]、种群的分子遗传学^[3]等进行过研究,但未见群体的生化遗传学方面的研究报道。本研究采用同工酶电泳技术,对溯河洄游到中国境内绥芬河产卵的三块鱼和珠星三块鱼繁殖群体的生化遗传结构及变异进行分析,探讨两者种群的遗传变异特性及其亲缘关系,以期积累生化遗传学资料,为野生种质资源的保护工作提供遗传学理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与处理

于2002年4~7月,三块鱼和珠星三块鱼采自中国绥芬河中游东宁河段野生繁殖群体,体长为30~45 cm,各30尾样本。活鱼解剖,取肝脏、肌肉等组织,分别编号放入液氮中带回实验室后,把样品转

移到低温冰箱(-80℃)保存待用。用于分析的样品加1~2倍体积量的Tis-HCl缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.0),匀浆后离心(4℃, 12×10^3 r/min, 10 min),取上清液用于点样电泳。

1.2 电泳方法

采用水平切片淀粉凝胶电泳。使用Sigma公司的淀粉胶(9%),采用TC(pH 7.0)和TBE(pH 8.6)两种电泳缓冲系统。染色方法参照王中仁^[4],略加改进。选取的12种同工酶的名称、编号、所用组织及电泳缓冲系统等情况见表1。将两种鱼放在同板淀粉凝胶中电泳,以进行对照比较。

1.3 酶位点与等位基因的编号

同工酶的缩写、基因位点及等位基因的命名基本采用Shaklee等^[5]推荐的方法。

1.4 群体遗传变异的统计分析

群体遗传变异的统计分析采用多态位点比例(P)、多态位点杂合度的观察值(H_o)与预期值(H_e)、Hardy-Weinberg遗传偏离指数(d)及群体平均杂合度(H);群体间的遗传相似度(I)及遗传距离(D)采用Nei方法^[6],分别以下列公式统计:

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

式中: k 为多态位点数; n 为所测位点总数。多态位点以其主要的等位基因频率低于0.99为标准。

收稿日期:2004-06-09;修订日期:2005-02-28。

基金项目:国家科技部公益性专项资金项目资助;中国水产科学研究院基金项目资助(2003-青-3)。

作者简介:马波(1974-),男,助理研究员,主要从事鱼类种质资源研究。Tel:0451-84861322-823。E-mail:haymb6@scm.com

表 1 分析的同工酶、组织及电泳缓冲系统

Tab.1 Isoenzymes, tissues and buffers used for electrophoresis

酶 Enzyme	缩写 Enzyme abbreviation	酶编号 Enzyme code	组织 Tissue	缓冲系统 Buffer
乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase	LDH	1.1.1.27	肌肉 肝脏 Muscle Liver	TC
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37	肌肉 肝脏 Muscle Liver	TC
苹果酸酶 Malic enzyme	ME	1.1.1.40	肌肉 Muscle	TC
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42	肌肉 肝脏 Muscle Liver	TC
α -磷酸甘油脱氢酶 α -glycerophosphate dehydrogenase	α -GPD	1.1.1.8	肝脏 Liver	TC
山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase	SDH	1.1.1.14	肝脏 Liver	TBE
磷酸葡萄糖异构酶 Glucose phosphate isomerase	GPI	5.3.1.9	肝脏 Liver	TBE
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase	AAT	2.6.1.1	肝脏 Liver	TBE
乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1	肝脏 Liver	TBE
过氧化氢酶 Catalase	CAT	1.11.1.6	肝脏 Liver	TBE
超氧化物歧化酶 Superoxide desmutase	SOD	1.15.1.1	肝脏 Liver	TBE
酯酶 Esterase	EST	3.1.1.-	肝脏 Liver	TBE

$$H_e = 1 - \sum x_i^2$$

式中, x_i 为该位点第 i 个等位基因频率。

$$d = (H_o - H_e) / H_e$$

式中, H_o 为观察到的杂合个体数在观察到的个体总数中的比值;

$$H = \sum (1 - \sum x_i^2) / n$$

式中, x_i 为等位基因 i 的频率; n 为所测位点总数。

$$I = \sum x_i y_i / \sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}; D = -\ln I$$

式中, x_i 为在种群 x 中第 i 个等位基因频率, y_i 为在种群 y 中第 i 个等位基因的频率。

2 结果与分析

2.1 多态基因位点比例

在肌肉、肝脏等组织中所分析的 LDH、MDH、ME、IDH、 α -GPD、ADH、SDH、GPI、CAT、AAT、EST、SOD 等 12 种同工酶中共检测出 27 个基因位点, 其中三块鱼群体中的 *Ldh-1*、 α -Gdh-1、*Sdh-1*、*Gpi-1*、*Aat-1* 和 *Est* 共 6 个基因位点为多态位点, 其多态比例为 22.22%; 珠星三块鱼群体中的 *Ldh-1*、 α -Gdh-1、*Sdh-1*、*Aat-1* 和 *Est* 共 5 个基因位点为多态位点, 其多态比例为 18.52%。

2.2 基因位点和等位基因频率统计

同板凝胶电泳结果表明, 两种鱼的同种同工酶具有相同的迁移位置, 即具有相同的基因位点。由图 1 和表 2 可见, 三块鱼和珠星三块鱼的多态位点上有相同的等位基因, 但在各自群体中等位基因的分布明显产生分化, 基因频率存在显著差异。两种鱼的 *Ldh-1* 多态位点上有相同的两个等位基因 (*Ldh-1*⁰ 和 *Ldh-1*⁻¹⁰⁰), 三块鱼中等位基因为 0 的频率 (0.100) 明显低于等位基因为 -100 的频率 (0.900); 珠星三块鱼中却相反, 等位基因为 0 的频率 (0.733) 明显高于等位基因为 -100 的频率 (0.267)。同时, 三块鱼群体中等位基因 *a-Gpd-1*⁻¹⁰⁰、*Sdh-1*⁻¹⁰⁰、*Aat-1*⁻¹⁰⁰ 和 *Est*¹²⁰ 的分布频率 (0.852、0.800、0.867 和 0.450) 明显高于珠星三块鱼 (0.233、0.267、0.600 和 0.150) 成为优势等位基因; 与其相对的等位基因 *a-Gpd-1*⁻¹⁴⁷、*Sdh-1*⁻¹⁴⁴、*Aat-1*⁻¹¹⁶ 和 *Est*¹²⁰ 的分布频率 (0.148、0.200、0.133 和 0.550) 又明显低于珠星三块鱼 (0.767、0.733、0.400、0.850) 成为珠星三块鱼的优势等位基因。三块鱼的 *Gpi-1* 位点为多态, 有 3 个等位基因 (-50、-100、-120), 表现出较为复杂的基因型; 而珠星三块鱼的 *Gpi-1* 位点上只有 1 个等位基因 (-100), 未检测到等位基因 -50 和 -120, 而表现为单态, 明显区别于三块鱼。

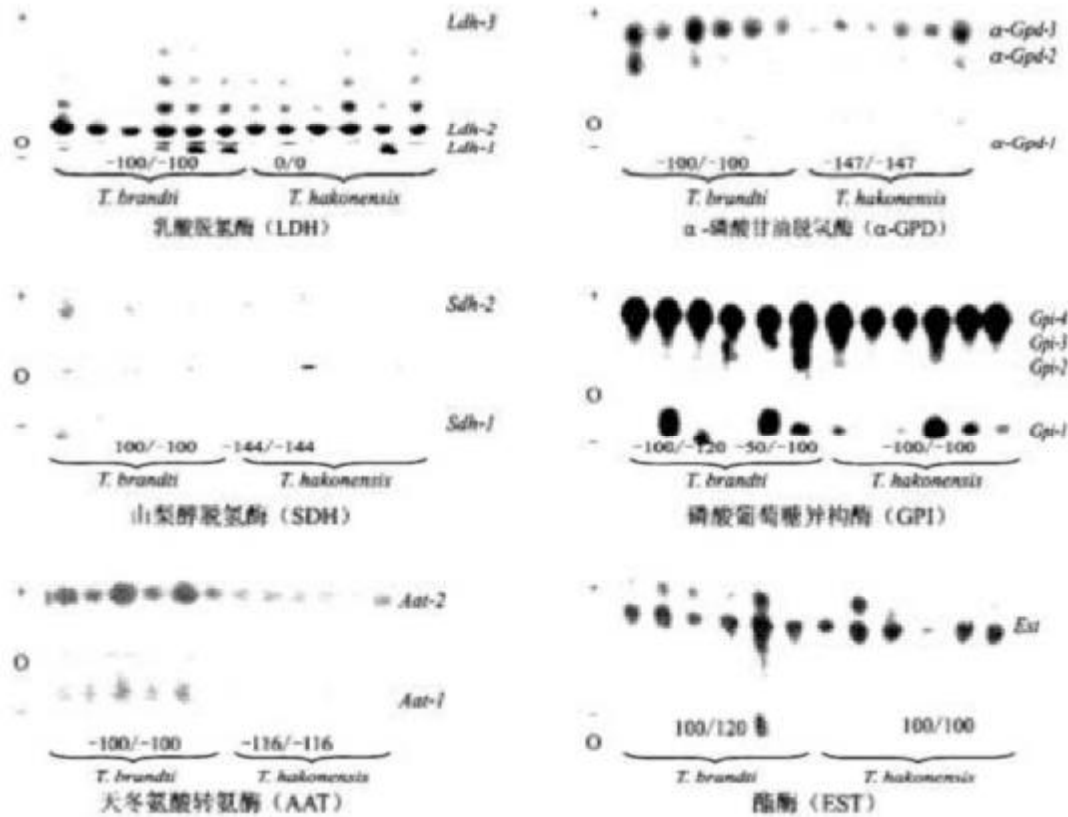


图1 绥芬河三块鱼和珠星三块鱼肝脏中多态位点的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of polymorphic loci in liver of *T. brandti* and *T. hakonensis* in the Suifen River

表2 绥芬河三块鱼与珠星三块鱼种群的基因位点和等位基因频率

Tab.2 Loci and allele frequencies of the populations of <i>T. brandti</i> and <i>T. hakonensis</i> in the Suifen River			
基因位点 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Alleles frequencies	
		三块鱼 <i>T. brandti</i>	珠星三块鱼 <i>T. hakonensis</i>
<i>Ldh-1</i>	0	0.100	0.733
	-100	0.900	0.267
<i>Ldh-2</i>	100	1.000	1.000
<i>Ldh-3</i>	100	1.000	1.000
<i>m-Mdh-1</i>	100	1.000	1.000
<i>m-Mdh-2</i>	100	1.000	1.000
<i>s-Mdh-1</i>	100	1.000	1.000
<i>s-Mdh-2</i>	100	1.000	1.000
<i>Mep</i>	100	1.000	1.000
<i>s-Idh</i>	100	1.000	1.000
<i>m-Idh-1</i>	100	1.000	1.000
<i>m-Idh-2</i>	100	1.000	1.000
<i>α-Gpd-1</i>	-100	0.852	0.233
	-147	0.148	0.767
<i>α-Gpd-2</i>	100	1.000	1.000
<i>α-Gpd-3</i>	100	1.000	1.000
<i>Sdh-1</i>	-100	0.800	0.267
	-144	0.200	0.733
<i>Sdh-2</i>	100	1.000	1.000
<i>Gpi-1</i>	-50	0.065	0.000
	-100	0.804	1.000
	-120	0.131	0.000
<i>Gpi-2</i>	100	1.000	1.000
<i>Gpi-3</i>	100	1.000	1.000
<i>Gpi-4</i>	100	1.000	1.000
<i>Aat-1</i>	-100	0.867	0.600
	-116	0.133	0.400
<i>Aat-2</i>	100	1.000	1.000
<i>Adh</i>	100	1.000	1.000
<i>Cat</i>	100	1.000	1.000
<i>Sod-1</i>	100	1.000	1.000
<i>Sod-2</i>	100	1.000	1.000
<i>Est</i>	100	0.550	0.850
	120	0.450	0.150

2.3 群体多态位点杂合度的观察值、预期值和遗传偏离指数

由表3可见,在三块鱼和珠星三块鱼群体中的 *Ldh-1*、 α -*Gpd-1*、*Sdh-1* 和 *Aat-1* 等多态位点上未检测到杂合基因型的个体,杂合度的观测值为0,偏离指数均为-1.000,基因型的分布显著地偏离

Hardy-Weinberg 平衡,表现为杂合子明显缺失,纯合子过剩;三块鱼的 *Est* 位点的杂合度偏离指数为0.818,又存在杂合子过剩现象。三块鱼的 *Gpi-1* 和珠星三块鱼的 *Est* 多态位点上的偏离指数分别为0.178和0.176,基因型分布接近 Hardy-Weinberg 平衡。

表3 绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群多态位点杂合度的观察值、预期值和遗传偏离指数

Tab.3 H_o , H_e and d values at polymorphic loci of the populations of *T. brundti* and *T. hakonensis* in the Suifen River

多态位点 Polymorphic locus	三块鱼 <i>T. brundti</i>			珠星三块鱼 <i>T. hakonensis</i>		
	H_o	H_e	d	H_o	H_e	d
<i>Ldh-1</i>	0.000	0.180	-1.000	0.000	0.391	-1.000
α - <i>Gpd-1</i>	0.000	0.252	-1.000	0.000	0.357	-1.000
<i>Sdh-1</i>	0.000	0.320	-1.000	0.000	0.391	-1.000
<i>Aat-1</i>	0.000	0.231	-1.000	0.000	0.498	-1.000
<i>Gpi-1</i>	0.391	0.332	0.178	0.000	0.000	—
<i>Est</i>	0.900	0.495	0.818	0.300	0.255	0.176

2.4 群体平均杂合度

由表2可知,三块鱼种群的平均杂合度为0.0670;珠星三块鱼种群的平均杂合度为0.0695。

2.5 遗传距离

据 Nei(1972)公式,绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群间遗传相似度为0.6912,遗传距离为0.3693。

3 讨论

3.1 三块鱼和珠星三块鱼种群的遗传结构及变异

多态位点比例和群体平均杂合度是反映群体生化遗传变异及其多样性的重要参数。脊椎动物的多态位点比例为15%~31%,平均杂合度在0.03~0.08^[7]。海洋鱼类一般多态位点比例为30%左右^[8],几种主要淡水鱼类的多态位点比例为11.8%~33.3%,平均杂合度为0.035~0.107^[9]。本研究所检测的绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群的多态位点比例分别为22.22%和18.52%,平均杂合度分别为0.0670和0.0695,两者的生化遗传变异程度及多样性在鱼类中处于中等水平。

一般认为,物种的遗传变异特性与物种对环境的适应能力密切相关,自然选择可以在生化遗传水平上导致种群产生分化。克氏亚口鱼(*Catostomus clarki*)的 *Est-1* 位点上两个等位基因的分布与环境温度相关^[10],贻贝(*Mytilus edulis*)的 *Lap* 基因位点上等位基因的频率与盐度呈相关性^[11],中国与日本产花鲈(*Lateolabrax japonicus*)等位基因频率的

不同反映出种群对不同盐度环境适应性的差异^[12]。三块鱼和珠星三块鱼种群的栖息环境有所不同^[13],三块鱼主要生活在海湾近岸区半咸水水域,珠星三块鱼主要生活在河口水域。由于盐度及温度等自然环境因素的影响,在种群遗传变异上出现适应各自生活环境的特性,主要表现为两种鱼相同等位基因的频率分布出现显著差异及分化。在三块鱼种群中 *Ldh-1*⁻¹⁰⁰、 α -*Gpd-1*⁻¹⁰⁰、*Sdh-1*⁻¹⁰⁰、*Aat-1*⁻¹⁰⁰ 和 *Est*¹²⁰ 等位基因频率显著高于珠星三块鱼,且在 *Gpi-1* 位点上比珠星三块鱼多含有2个等位基因,可能更适应盐度较高的环境;而珠星三块鱼种群中的 *Ldh-1*⁰、 α -*Gpd-1*⁻¹⁴⁷、*Sdh-1*⁻¹⁴⁴、*Aat-1*⁻¹¹⁶ 和 *Est*¹⁰⁰ 等位基因频率又显著高于三块鱼,可能更适应盐度较低的环境。两者相同基因位点上的不同等位基因可能对不同盐度、温度等相对稳定的环境具有不同的适应性,而各自成为对环境具更强适应能力的优势等位基因。通过对比三块鱼和珠星三块鱼两个生活于不同自然环境中种群的遗传特性差异,说明自然选择可以在生化遗传水平上导致种群产生分化的现象。

三块鱼和珠星三块鱼的 *Ldh-1*、 α -*Gpd-1*、*Sdh-1*、*Aat-1* 多态位点上的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数均为-1.000,表现为两种鱼群体中杂合子明显缺失,纯合子过剩。这种在种群中大多基因位点上均出现稳定而又明显的杂合子缺失现象,显然并不是由于遗传漂变或遗传瓶颈等原因造成,可能为其

种群在自然环境中某些基因位点上的纯合子比杂合子对环境有更强的适应能力而更多地得以表达。在对海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 子代的 *Pgm* 位点的研究发现, 纯合子和杂合子的死亡率有明显的不同, 两者对环境有不同的适应性^[14]。但同时, 三块鱼种群中的 *Est* 位点的杂合度偏离指数较高 (0.818), 而又明显存在杂合子过剩现象。同样, 两种鱼种群中某些基因位点上杂合子明显缺失或过剩也应是不同生活环境适应的结果。

3.2 三块鱼和珠星三块鱼的亲缘关系及其分类地位

三块鱼和珠星三块鱼都能洄游上溯到中国绥芬河上游河滩处产卵, 但其洄游产卵的时间和产卵水温却不尽相同^[15]。珠星三块鱼洄游产卵的时间为每年的4月下旬至5月下旬, 适宜产卵的水温为7~14℃; 而三块鱼洄游产卵的时间为每年的5月中旬至6月下旬, 适宜产卵水温为17~21℃, 洄游繁殖的时间基本上不重叠。虽然产卵的天然水域环境相同, 但由于两者的栖息水域和繁殖习性等不同, 因而种群间存在一定的地理隔离和生殖隔离。物种在进化过程中往往因为地理隔离或是生殖隔离而形成种、亚种或不同种群。同工酶的生化遗传学分析表明, 三块鱼和珠星三块鱼具有相同的基因位点和等位基因而表现出有很近的亲缘关系, 表明两者应是由共同的祖先分化而来, 但由于进化中逐渐出现了地理隔离和生殖隔离, 从而在遗传特性上产生稳定而显著的变异和分化, 种群间存在着明显的基因交流障碍, 未发现有过渡基因类型的群体。三块鱼和珠星三块鱼的生化遗传相似度为0.6912, 遗传距离为0.3693, 分化程度已达到了种间水平。此前, 对三块鱼属的属名及分类一直存在争议^[15], 最近学者们根据形态学差异将分布在中国境内绥芬河和图们江的三块鱼和珠星三块鱼归为三块鱼属的两个种^[1], 本研究从种群生化遗传学角度上验证了形态学的分类结论。

致谢: 在本文完成过程中得到黑龙江水产研究所刘海金研究员的帮助, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 陈宜瑜. 中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲱形目(中卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 72-75.
- [2] 董崇智, 赵春刚, 金贞礼, 等. 绥芬河滩头腹罗鱼属水生昆虫体结构的探讨[J]. 水产学报, 1993, 17(4): 304-311.
- [3] 陈金平, 梁利群, 孙效文, 等. 绥芬河三块鱼属鱼类和东北腹罗鱼亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 1-4.
- [4] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 95-106.
- [5] Shuker J B. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: proposed guidelines[J]. Trans Amer Fisher Soc, 1989, 118: 218-227.
- [6] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Amer Naturalist, 1972, 6: 283-293.
- [7] Kirpichnikov V S. genetic bases of fish selection[M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. 143-200.
- [8] 曹呈奎, 相建海. 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科技出版社, 1998. 283-309.
- [9] 李思发, 吴力钊, 王 强. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究[M]. 上海: 上海科学出版社, 1998. 71-90.
- [10] Koehn R K. Functional and evolutionary dynamics of polymorphic esterase in catostomid fishes[J]. Trans Amer Fisher Soc, 1970, 99(1): 219-228.
- [11] Koehn R K. Biochemical aspects of genetic variation at the Lap-locus in *Mytilus edulis*[A]. Marine organisms, genetics, ecology, evolution[M]. New York: Plenum Press, 1978. 211-225.
- [12] 楼 东, 高天翔, 张秀梅, 等. 中日花鲈生化遗传变异的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 22-28.
- [13] Kurawaka K. Cephalic lateral-line systems and geographical distribution in the genus *Tribolodon* (Cyprinidae)[J]. Jap Ichthyol, 1977, 24: 167-175.
- [14] 薛秋明, Sheila S, 张福强, 等. 海湾扇贝不同种群在葡萄糖氧化酶位点基因位点的遗传结构与性状[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 381-389.
- [15] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995. 52-55.
- [16] 陈金平. 绥芬河三块鱼属鱼类的分类学讨论[J]. 水产学杂志, 2001, 14(2): 82-83.

Biochemical genetic variations and relationships for populations of *Tribolodon brandti* and *Tribolodon hakonensis* in the Suifen River, China

MA Bo, CHEN Jin-ping, DONG Chong-zhi

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: *Tribolodon brandti* and *Tribolodon hakonensis* are especially economic fishes. The adults migrate into freshwater rivers, the Suifen River and the Tumen River, from the sea of Japan for spawning. In order to discuss the hereditary constitution and variation of the two populations and investigate the character of genetic differentiation, genetic relationship and classified position, the starch gel electrophoresis was used to analyze the isoenzymes in the Suifen River breeding populations. The results demonstrated that twelve isoenzymes (LDH, MDH, ME, IDH, α -GPD, ADH, SDH, GPI, CAT, AAT, EST and SOD) were coded by 27 gene loci. Six loci (*Ldh-1*, *α -Gpd-1*, *Sdh-1*, *Gpi-1*, *Aat-1* and *Est*) in *T. brandti* population and five loci (*Ldh-1*, *α -Gpd-1*, *Sdh-1*, *Aat-1* and *Est*) in *T. hakonensis* population were found polymorphic, and the mean proportions of polymorphic loci in the two populations were 22.22% and 18.52% respectively, and average heterozygosity (H) of the two species of fishes were 0.0670 and 0.0695. Allele frequencies of $Ldh-1^{100}$, $\alpha-Gpd-1^{100}$, $Sdh-1^{-100}$, $Aat-1^{-100}$ and Est^{120} in *T. brandti* population was significantly higher than *T. hakonensis*, and allele frequencies of $Ldh-1^0$, $\alpha-Gpd-1^{-147}$, $Sdh-1^{-144}$, $Aat-1^{-118}$ and Est^{100} in *T. hakonensis* population was striking higher than those in *T. brandti*. In addition, the two species of fish possess their own prevalent allele respectively. The observational value of heterozygosity (H_o) of *Ldh-1*, *α -Gpd-1*, *Sdh-1* and *Aat-1* was 0, and their deviation index (d value) of heterozygosity was -1.000 in the two populations. H_o of *Est* in *T. brandti* population was 0.900, and d value was 0.818. Remarkable deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were observed at the loci of *Ldh-1*, *α -Gpd-1*, *Sdh-1* and *Aat-1* in the two species of fishes except *Gpi-1* in *T. brandti* and *Est* in *T. hakonensis*. Significant heterozygote absent was observed with *Ldh-1*, *α -Gpd-1*, *Sdh-1* and *Aat-1*, as well as the homozygote excess with *Est* in *T. brandti* and *T. hakonensis*. The genetic distance and genetic similarity between the two breeding fishes was 0.3693 and 0.6912. The genetic diversity levels of the two fishes were up to species level.

Key words: *Tribolodon brandti*; *Tribolodon hakonensis*; isoenzyme; genetic variation; genetic distance