

3 个群体鳊鱼 mtDNA D-loop 区段的限制性片段长度多态性分析

单 洪¹, 董 仕¹, 吴海防¹, 谷口顺彦²

(1. 天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300074; 2. 东北大学大学院 农学研究科, 日本 宫城县 仙台市 981-8555)

摘要:鳊鱼(*Aristichthys nobilis*)采自江西瑞昌、湖南长沙的天然群体以及天津宁河的人工繁殖群体共 127 尾,对其线粒体 DNA 的 D-loop 区段进行 PCR 扩增,使用 12 种核酸内切限制酶酶切。酶切结果显示,在 12 种内切酶中,8 种有酶切位点,2 种个体间有变异,为 *Afa*I 和 *Hinf*I,共得到 7 种单倍型。依据单倍型频率的组成情况,计算出瑞昌与长沙、宁河群体间的 Rogers 遗传距离分别为 0.728 3 和 0.500 7,长沙和宁河群体间的 Rogers 遗传距离为 0.813 5。*Afa*I 的酶切类型 C 和 *Hinf*I 的酶切类型 B 组成的单倍型,在长沙群体中占 87.5%,而在瑞昌和宁河群体中均为零。由此可以认为鳊鱼瑞昌群体和长沙群体可能是两个隔离的独立群体。[中国水产科学,2006,13(2):174-180]

关键词:鳊鱼;mtDNA D-loop;RFLP;Rogers 遗传距离;核苷酸多样性;核苷酸歧化距离;遗传多样性

中图分类号:Q959.468 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0174-07

鳊鱼(*Aristichthys nobilis*)隶属于鲤科(Cyprinidae)、鲤亚科(Cyprininae),是中国主要淡水养殖鱼类,与鲢鱼、草鱼、青鱼一起并称四大家鱼。目前,鳊鱼正面临品种退化和复壮问题,因此,对其进行分子水平的遗传标记和系统演化研究非常必要^[1]。包括鱼类在内的动物线粒体 DNA(mtDNA)呈母系遗传特性,且进化速度快于核基因组 DNA^[2]。应用 PCR 技术对 mtDNA 上进化速度最快的 D-loop 区段^[3]进行扩增,扩增产物利用核酸内切限制酶处理,得到的限制性片段长度多态(RFLP)或限制性内切酶图谱具有相对的稳定性,又能反映一定的变异,是从分子水平研究动物种群遗传学和进化遗传学的一种有效手段^[4]。已有一些学者应用同工酶、RAPD、mtDNA 的 RFLP 等检测技术对长江等水系鳊鱼群体的种群遗传结构进行了分析^[5-7]。为了比较长江以及湘江产鳊鱼的遗传差异,本研究应用 mtDNA 的 PCR-RFLP 检测技术,对采自江西瑞昌长江四大家鱼原种场以及湖南省鱼类原种场的鳊鱼的遗传多样性进行分析,并与采自天津市换新国家级水产良种场的人工繁育群体进行比较,以便了解长江干流和长江支流湘江的不同地理群体鳊鱼的遗传差异以及人工繁殖群体的遗传组成情况,为鳊鱼种质资源的保护与利用、遗传育种等

提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

江西瑞昌鳊鱼于 2004 年 6 月采自江西瑞昌长江四大家鱼原种场(2003 年 6 月捕自长江瑞昌段的天然水花鱼苗,在场内养殖),湖南长沙鳊鱼于 2004 年 4 月采自湖南省鱼类原种场(2002 年 5~6 月捕自湘江长沙段的天然水花鱼苗,在场内养殖),天津宁河鳊鱼采自天津市换新水产良种场(1976 年由武汉购入的长江原种,2003 年人工繁殖的第 5~6 代鱼种)。3 个群体鳊鱼的尾数、体长及体重见表 1。

表 1 实验用鳊鱼样本数量和体长、体重

Tab.1 Sampling size of bighead carp

群体 Population	n	体长/cm Body length ($\bar{X} \pm SD$)	体质量/g Body weight ($\bar{X} \pm SD$)
瑞昌 Ruichang	47	24.29 ± 3.19	306.7 ± 149.06
长沙 Changsha	32	57.13 ± 4.24	4 180.0 ± 820.0
宁河 Ninghe	48	10.75 ± 0.70	29.1 ± 5.69

1.2 总 DNA 的提取

在鲜活状态下,从每尾实验鱼体上剪取 1.0 cm

收稿日期:2005-06-20; 修订日期:2005-08-16.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471344);天津师范大学校内基金(5RL021).

作者简介:单 洪(1979-),男,硕士在读,主要从事细胞生物学研究.

通讯作者:董 仕. Tel: 022-23540996; E-mail: qjt185@sohu.com

×0.5 cm 大小的尾鳍鳍条,放入装有无水乙醇的 1.5 mL 离心管中保存备用。提取 DNA 时,将鳍条放入加有 700 μ L TNES-Urea 的离心管中,并加入蛋白水解酶 K,混匀后 37 $^{\circ}$ C 过夜。用等体积苯酚、氯仿混合液抽提,提取的 DNA 中加入 TE 缓冲液,4 $^{\circ}$ C 保存^[8]。

1.3 mtDNA 的 D-loop 区段的扩增

使用位于 mtDNA 的 D-loop 区段两侧的引物进行了实验鱼的 D-loop 区段的扩增。引物碱基排列顺序为 L15923^[9]: 5'-TTAAAGCATCGGTCTTGTAA-3'; H1067^[10]: 5'-ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT-3'。PCR 反应体系为 50 μ L,模板 DNA 0.4 μ g,两种引物各 100 pmol, dNTP 5 μ L,缓冲液 (10 $\times$) 5 μ L, TaqDNA 聚合酶 2.5 U,双蒸水加至 50 μ L。其中 dNTP、缓冲液和 TaqDNA 聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。PCR 扩增反应在 Biometra 公司的 T-GRADIENT Thermoblock PCR 仪上完成。扩增程序为预变性:94 $^{\circ}$ C 1 min,1 个循环;变性 94 $^{\circ}$ C 1 min,退火 48 $^{\circ}$ C,1 min,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min。

1.4 内切酶酶切及凝胶电泳

12 种核酸内切限制酶为 *Afa* I、*Alu* I、*Bam* H I、*Eco* R I、*Hae* III、*Hap* II、*Hind* III、*Hinf* I、*Pst* I、*Taq* I、*Xba* I 和 *Xsp* I,均购自宝生物工程(大连)有限公司。利用这 12 种内切酶对扩增的 3 组鳙鱼的 mtDNA D-loop 区段进行酶切,内切酶及缓冲液用量参照厂家的说明书。酶切片段经琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,UV 公司的 3UVTM Transilluminator 紫外透射仪下观察照相。依据电泳时加入 200 bp 的 λ DNA ladder(天为时代,200~4 000 bp)以及 100 bp 的 DNA ladder (QiRangeRulerTM 100~1 500 bp)估算酶切片段的长度。

1.5 数据处理和分析

一种内切酶酶切、电泳后,用 A、B、C 等字母来命名不同个体间出现的不同的酶切类型。对每一个体的 mtDNA D-loop 区段有酶切位点的几种酶的酶切类型组合后,构成这个个体的单倍型(haplotype)^[5]。

参照 Nei 等^[11]的方法计算单倍型多样性指数(h)。

单倍型多样性指数根据以下公式估算:

$$h = [n/(n-1)] \left(1 - \sum_{i=1}^l x_i^2\right)$$

式中, x_i 为第 i 种单倍型在群体中的频率; n 为样品数; l 为单倍型总数。

利用所采用的内切酶数目及获得的单倍型资料建立单倍型文件;利用内切酶酶切位点和识别序列资料建立内切酶文件。应用 REAP(restriction enzyme analysis package)软件中的 GENERATE、D、DA 程序处理上述两文件。可估算单倍型间的核苷酸序列歧化距离(nucleotide divergence)、群体内和群体间的核苷酸序列多样性指数(nucleotide diversity, π)以及群体间的核苷酸序列歧化距离^[12-14]。

根据单倍型在各群体间的频率,计算出群体间的 Rogers 遗传距离^[15-16],应用 PHYLIP (Version 3.63)软件包中的 NEIGHBOUR 程序构建群体的 UPGMA 聚类图^[17]。应用 REAP 软件中的 MONTE 程序进行 1 000 个随机变换的卡方检验,以检验 mtDNA 单倍型在 3 个群体间是否存在差异^[18]。

2 结果

2.1 mtDNA D-loop 的 PCR 扩增

分别以提取的 3 个群体 127 尾鳙鱼的 DNA 为模板进行 mtDNA D-loop 的扩增,均得到大小相同的扩增片段,约为 1.6 kbp。图 1 显示瑞昌群体 1~4 号个体的 PCR 扩增后的电泳结果。

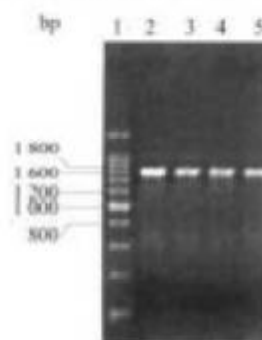


图 1 D-loop 区段的扩增片段

1:200 bp Ladder 标准物; 2~5:瑞昌群体 1~4 号个体

Fig.1 Amplified product of D-loop region
1:200 bp Ladder Marker;

2-5:Samples 1-4 of Ruichang population

2.2 RFLP 分析

对所扩增的 D-loop 区段进行酶切的 12 种核酸内切限制酶中,有酶切位点的 8 种(*Afa* I、*Alu* I、*Eco* R I、*Hae* III、*Hap* II、*Hinf* I、*Taq* I、*Xsp* I),

个体间有变异的是 *Afa* I 和 *Hinf* I (表2)。图2显示了有酶切位点的8种酶对所有实验鱼酶切后的电泳结果。其中有变异的两种酶在不同个体各有3种酶切类型,分别用A、B和C表示,另外6种酶对所有实验鱼的不同个体虽有酶切位点,但没有变异出现,即一种酶对所有个体的酶切结果均相同,在3个群体中全部个体均用A表示其酶切类型。*Afa* I 和 *Hinf* I 各产生的3种酶切类型的频率在3个群体中有明显差别。图3显示了瑞昌和长沙群体各14

尾个体的 *Hinf* I 酶切后的电泳结果。不同酶切结果组合后,共得到7种单倍型(表3)。这7种单倍型两两之间的核苷酸序列歧化距离如表4所示。瑞昌、长沙以及宁河3个群体内的单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数见表5。群体间的核苷酸序列歧化距离及 Rogers 遗传距离见表6和表7。3个群体间遗传距离的UPGMA聚类图(图4)表明,瑞昌群体与宁河群体的亲缘关系更为接近。

表2 3个群体鳊鱼核酸内切限制酶酶切片段长度类型
Tab.2 Restriction fragment patterns in three populations of bighead carp

内切酶 Digestive enzyme	限制性类型 Limited type	片段数 Segment number	限制性片段大小/kb ^a Length of segment ^a
<i>Afa</i> I	A	4	1.05, 0.27, 0.15, 0.1
	B	5	0.65, 0.4, 0.27, 0.15, 0.1
	C	4	1.05, 0.27, 0.18, 0.1
<i>Alu</i> I	A	4	0.7, 0.38, 0.25, 0.18
<i>Eco</i> RI ^b	A		
<i>Hae</i> III	A	2	1.4, 0.15
<i>Hap</i> II	A	3	1.3, 0.2, 0.1
<i>Hinf</i> I	A	4	0.85, 0.3, 0.24, 0.15
	B/C	4	0.85, 0.25, 0.24, 0.15
		4	0.85, 0.25, 0.24, 0.2
<i>Taq</i> I	A	2	0.9, 0.7
<i>Xsp</i> I	A	2	1.1, 0.35

注:a—由于 Marker 的限制,小于100 bp 的带忽略不计; b—*Eco*RI 的酶切片段复杂,无法计数片段数,但可判断只有一种酶切类型出现。
Note: a—Bands smaller than 100 bp were omitted due to the marker's limitation; b—Segments of *Eco*RI were too complicated to count, but only one fragment pattern could be recorded.

表3 mtDNA 单倍型数目及其在3个鳊鱼群体内的分布频率
Tab.3 Numbers and frequencies of mtDNA haplotypes in three populations of bighead carp

单倍型编号 Haplotype no.	组成 [*] Composition [*]	单倍型数目及在群体内的分布频率 Haplotype numbers and distribution frequency			合计 Total
		瑞昌 Ruichang	长沙 Changsha	宁河 Ninghe	
1	AAAAAAA	11 (0.2340)	0	6 (0.1250)	17
2	AAAABAA	22 (0.4681)	1 (0.0313)	1 (0.0208)	23
3	AAAACAA	0	1 (0.0313)	0	1
4	BAAAAAA	0	1 (0.0313)	6 (0.1250)	7
5	CAAAAAA	4 (0.0851)	1 (0.0313)	0	5
6	CAAABAA	0	28 (0.8748)	0	29
7	CAAACAA	10 (0.2128)	0	35 (0.7292)	45
合计 Total		47	32	48	127

* * 命名单倍型时酶的顺序为: *Afa* I, *Alu* I, *Hap* II, *Hae* III, *Hinf* I, *Taq* I, *Xsp* I。括号中数值为分布频率。

* * * The sequence of the enzymes when haplotypes were nominated: *Afa* I, *Alu* I, *Hap* II, *Hae* III, *Hinf* I, *Taq* I, *Xsp* I. The data in brackets are haplotype distribution frequencies.

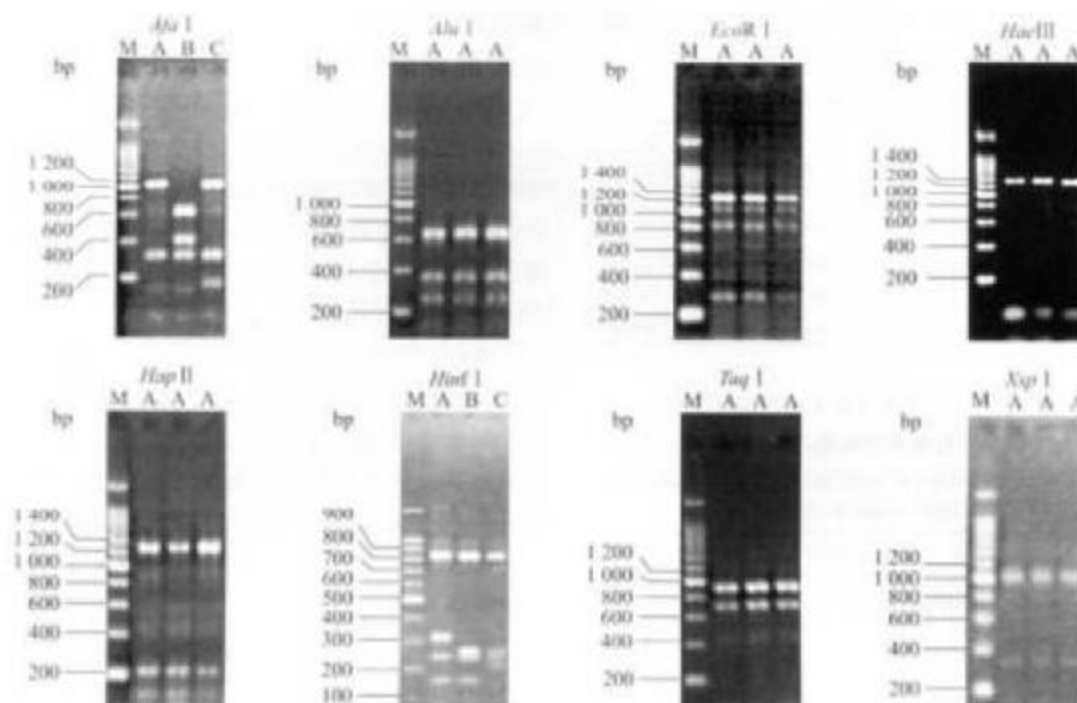
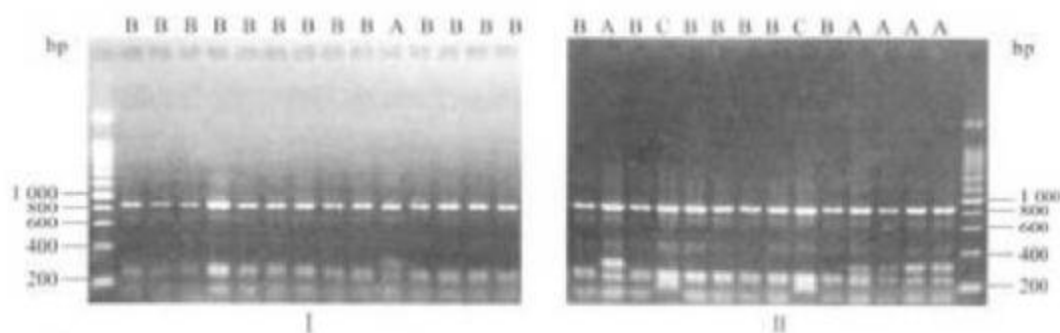


图2 鳊鱼3个群体中8种核酸内切限制酶电泳图谱

A,B,C 分别表示不同的酶切类型(表2)

Fig.2 Electrophoretic patterns of eight restriction endonucleases

A,B and C represent different limited type, respectively (See Tab.2)

图3 鳊鱼瑞昌群体与长沙群体各14尾个体的 *Hinf* I 酶切电泳图谱

I:长沙群体;II:瑞昌群体

Fig.3 Electrophoretic patterns of *Hinf* I of 14 samples of bighead carp in Ruichang and Changsha populations

I:Population of Changsha; II:Population of Ruichang

3 讨论

3.1 群体内和群体间的遗传变异程度

核苷酸多样性指数(π)被定义为某群体内一组DNA序列的单位位点的核苷酸差异或替代的平均数。它是衡量DNA多态程度的最有用的指标之

一[12,19]。另外,线粒体DNA的单倍型多样性指数同样可以衡量群体内的变异程度,它的含义类似于核DNA的杂合度[11]。本研究得到的瑞昌和宁河群体的 π 值分别为0.00511和0.00667,略低于李思发等[5]报道的长江流域鳊鱼的3个群体的平均值(0.008),与鲤科其他鱼类相比,这两个群体的 π 值

表4 3个群体鳊鱼的7种单倍型间的核苷酸序列歧化距离

Tab.4 Nucleotide divergences among seven mtDNA haplotypes of three populations of bighead carp						
	1	2	3	4	5	6
2	0.004084					
3	0.008408	0.004084				
4	0.006062	0.010404	0.015020			
5	0.004084	0.008408	0.013007	0.010404		
6	0.008408	0.004084	0.008408	0.015020	0.004084	
7	0.013007	0.008408	0.004084	0.019942	0.008408	0.004084

表5 鳊鱼3个群体内单倍型多样性指数(h)和核苷酸多样性指数(π)

Tab.5 Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) within three populations of bighead carp			
指数 Index	瑞昌 Ruichang	长沙 Changsha	宁河 Ninghe
h	0.6883	0.2379	0.4459
π	0.005111	0.001907	0.006665

表6 鳊鱼3个群体间的核苷酸歧化距离

Tab.6 Nucleotide divergence among three populations of bighead carp		
	瑞昌 Ruichang	长沙 Changsha
长沙 Changsha	0.00181	
宁河 Ninghe	0.00185	0.00213

表7 鳊鱼3个群体间的 Rogers 遗传距离

Tab.7 Rogers genetic distance among three populations of bighead carp		
	瑞昌 Ruichang	长沙 Changsha
长沙 Changsha	0.7283	
宁河 Ninghe	0.5007	0.8135

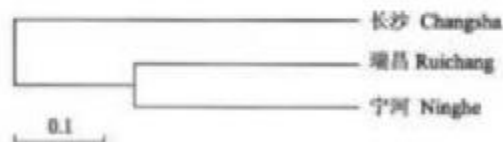


图4 鳊鱼3个群体 Rogers 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.4 UPGMA phenogram of three populations based on Rogers distance

高于建鲤的 0.001 64^[20] 和长江中下游草鱼的 0.002^[5], 但明显低于瓯江彩鲤的 0.028 6^[21]。长沙群体的 π 值较低, 仅为 0.001 91。瑞昌和宁河群体的单倍型多样性指数分别为 0.688 3 和 0.445 9, 与

李思发等^[5]报道的鳊鱼结果(0.584)相近, 而长沙群体仅为 0.237 9。

根据 1 000 个变换的卡方检验结果, 瑞昌、长沙和宁河 3 个群体间有显著遗传差异 ($P < 0.001$)。宁河群体是在 30 年前采自武汉, 它与瑞昌群体均来自长江干流, 两者的差异可能是宁河的起始群体与瑞昌群体本来就有差异, 或是经过近 30 年间 5~6 代的人工选择所造成。

本研究结果显示, 长沙群体的 32 尾样品中属于第 6 种单倍型的有 28 尾, 达 87.48%。而在瑞昌以及宁河群体中, 没有检测到这种单倍型。由此认为, 这可能是由于采自湘江的鳊鱼与采自长江瑞昌段的鳊鱼有生殖隔离, 形成各自独立的孟德尔群体 (Mendelian population), 各自具有独立的基因库。并且使用 *Afa* I 和 *Hinf* I 两种核酸内切限制酶对 PCR 扩增的 mtDNA 的 D-loop 区段进行酶切, 可以有效地区分长沙和瑞昌的两个群体。至于长江鳊鱼与湘江鳊鱼的天然种群在地理上的分化水域位于何处有待进一步研究。长沙群体内的变异程度明显低于瑞昌和宁河群体的变异程度, 可以认为长沙群体的遗传多样性低于瑞昌和宁河群体。

3.2 分析方法的探讨

估算单倍型核苷酸歧化距离以及群体内核苷酸多样性指数 (π) 可以使用 DNA 碱基排列顺序、限制酶切位点数据 (即酶切位点排列顺序及数目) 和限制酶切片段数据^[14,22]。显然 DNA 测序是比较遗传差异最直接的手段。Saitoh 等^[22]认为, 限制酶酶切分析也同样是一种高灵敏度和可重复性的实验方法。本研究中所使用的限制酶切片段数据与限制酶切位点数据类似, 在多样性分析的准确度上虽不及限制酶切位点数据^[22], 但这种方法既可免去构建限制位点图谱的繁杂, 又比测序方法经济简便。所以这一方法在同种或亲缘关系很近的物种多样性分析中依然适用^[14]。

目前, 在线粒体 DNA 某些区段的 PCR-RFLP 方法分析中, 群体间遗传距离可以用两种表示方法: 一种是 Rogers 遗传距离^[15-16]; 另一种是群体间的核苷酸序列歧化距离^[5,23-24]。群体间的核苷酸序列歧化距离是通过群体间及群体内的核苷酸多样性指数计算得来的, 包括了单倍型的频率数据以及每种单倍型的组成。而计算 Rogers 遗传距离时考虑的是两两群体间的各单倍型频率的差异情况。在本

研究中,长沙群体的第6种单倍型频率呈绝对优势,如果计算核苷酸序列歧化距离,3个群体间的差异并不明显,而使用 Rogers 遗传距离,可以显示出与各群体的单倍型频率相一致的趋势。由此认为,用 Rogers 遗传距离进行各群体的聚类分析应该更直观。

致谢:在样品采集过程中,得到了农业部全国水产技术推广总站苗种处胡红浪处长、湖南省水产科学研究所李传武研究员、江西瑞昌长江四大家鱼原种场桂贤龙场长和天津市塘新水产良种场金万昆场长的帮助,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 宋 平,刘小迎,熊全沐. 鳊鱼线粒体 DNA 的九种限制性内切酶酶切图谱的比较[J]. 水产学报,1994,18(3):221-230.
- [2] Wesley M B, Matthew G JR, Allen C W. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(4): 1967-1971.
- [3] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-392.
- [4] 吴清江,桂建芳,崔宗斌,等. 鱼类遗传育种工程(第二版)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999. 153-154.
- [5] 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L. 长江中下游鳊鱼草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报,1998,44(1):82-93.
- [6] 樊连春,崔建勋,余其兴. 鳊鱼线粒体 DNA 的限制性内切酶图谱[J]. 武汉大学学报,1994,40(1):121-125.
- [7] 姜建国,熊全沐,姚放华. 青草鳊四种鱼同工酶的比较研究[J]. 遗传,1998,20(2):19-22.
- [8] Perez-Enrique R, Taniguchi N. Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population of Japan and the Southwest Pacific using microsatellite DNA markers [J]. Fish Sci, 1999, 65 (1): 23-30.
- [9] Iguchi K, Tanimur Y, Nishida M. Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu[J]. Fish Sci, 1997, 63: 901-905.
- [10] Takahashi Y, Kohyoshi T, Ueda T. Genetical variation of the D-loop region in mitochondrial DNA using PCR method in metropolitan bitterling[J]. Fish Genet Breed Sci, 1994, 20: 39-45.
- [11] Nei M, Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases[J]. Genetics, 1981, 97: 145-163.
- [12] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci U S, 1979, 76(10): 5296-5273.
- [13] McElroy D, Moran P, Bermingham E, et al. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data[J]. J Hered, 1992, 83: 157-158.
- [14] Nei M, Joyce C M. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data[J]. Genetics, 1990, 125: 873-879.
- [15] Chow S, Okamoto H, Uonami Y, et al. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphius gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region[J]. Mar Biol, 1997, 127: 359-367.
- [16] Sagaya T, Ikeda M, Fujio Y. Comparison for the genetic variabilities of natural and seed populations of Japanese flounder based on PCR-RFLP analysis of mtDNA D-loop[J]. Fish Genet Breed Sci, 1999, 28: 65-73.
- [17] Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) Version 3.63[M]. Seattle: University of Washington, 1993.
- [18] Derek A R, Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X^2 and the problem of small samples[J]. Mol Biol Evol, 1989, 6 (5): 539-545.
- [19] Nei M, Li J. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations[J]. Mol Biol Evol, 1989, 6 (3): 290-300.
- [20] 郑冰蓉,管瑞光,张亚平. 建鲤线粒体 DNA 的遗传多态性初步分析[J]. 水利渔业,2000,20(5):11-12.
- [21] 王成辉,李思发,徐志彬,等. 瓯江彩鲤线粒体 DNA 的限制性内切酶分析[J]. 上海水产大学学报,2002,11(1):14-18.
- [22] Saich K, Tanaka M, Ueshima R, et al. Preliminary data on restriction mapping and detection of length variation in Japanese flounder mitochondrial DNA[J]. Aquaculture, 1995, 136: 109-116.
- [23] 肖武汉,张亚平. 银鲫自然群体线粒体 DNA 的遗传分化[J]. 水生生物学报,2000,24(1):1-10.
- [24] Ikeda M, Taniguchi N. Genetic variation and divergence in populations of ayu *Plecoglossus altivelis*, including endangered subspecies, inferred from PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region[J]. Fish Sci, 2002, 68: 18-26.

Diversity analysis on mtDNA D-loop region of three populations of *Aristichthys nobilis*

SHAN Qi¹, DONG Shi¹, WU Hai-fang¹, Taniguchi Nobuhiko²

(1. College of Chemistry and Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China; 2. Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan)

Abstract: To compare the genetic differences among two wild bighead carp (*Aristichthys nobilis*) populations and one artificial propagated population, the D-loop region on the mitochondrial DNA of 127 individuals of bighead carp was PCR-amplified by the primers and surveyed by 12 restriction endonucleases. The wild samples were collected from the middle-reach of the Yangtze River (Ruichang section in Jiangxi Province) and the Xiangjiang River, the branch of the Yangtze River (Changsha section in Hunan Province), respectively. The artificial propagated population, F₃ - F₆ originated from the main stream of the Yangtze River 30 years ago, were collected from hatchery station in Ninghe area, Tianjin City. The results showed that about 1.6 kb DNA fragments were amplified. The restriction sites could be detected by eight endonucleases (*Afa* I, *Alu* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hap* II, *Hinf* I, *Taq* I and *Xsp* I), of which, *Afa* I and *Hinf* I showed polymorphism and seven haplotypes were scored. Based on the haplotype frequencies, the Rogers genetic distances between Ruichang population and Changsha population, Ruichang population and Ninghe population, and Changsha population and Ninghe population were 0.728 3, 0.500 7 and 0.813 5, respectively. Also, χ^2 test revealed the significant variances among the three populations. The haplotype composed of *Afa* I's C pattern and *Hinf* I's B pattern, occupying 87.5% in Changsha population, while it was undetectable in the other two populations. Therefore, Ruichang population and Changsha population could be viewed as independent populations. In addition, the feasibility of the analytical method applied in the study was discussed. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 174 - 180]

Key words: *Aristichthys nobilis*; mtDNA D-loop; RFLP; Rogers distance; nucleotide diversity; nucleotide divergence; genetic diversity

Corresponding author: DONG Shi. E-mail: tjlt185@sohu.com