文章编号：1004－7271(2000)04－0285－05

应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析

杜长斌[1]，孙孝文[2]，楼允东[1]，沈俊宝[2]

(1.上海水产大学渔业学院，上海 200090；2.黑龙江水产科学研究所，黑龙江 哈尔滨 150070)

摘 要：用自行设计的16对微卫星引物研究了野鲤、高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系的群体内遗传变异及相互间的关系。微卫星分析结果表明：野鲤、高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系平均扩增条带分别为4.91、2.82和2.45，平均杂合度观测值分别为0.64、0.40和0.38。表明野鲤的遗传多样性水平最高，高寒鲤次之，荷包红鲤抗寒品系最低。说明了人工繁育和养殖实践会造成物种遗传多样性的降低。本试验共发现了1个群体特异性标记209bp，为进一步研究此标记与性状的连锁关系和分子标记辅助育种奠定了基础。同时，还对三群体间的遗传距离作了估算，并进行了聚类分析，结果重演了两选育品系的培育过程。

关键词：微卫星；杂合度；鲤

中图分类号：S917 **文献标识码**：A

The genetic heterozygosity analysis to wild carp and two cultivated strains of common carp using microsatellite technique

DU Chang-bin[1], SUN Xiao-wen[2], LOU Yun-dong[1], SHEN Jun-bao[2]

(1. *Fisheries College, SFU, Shanghai* 200090, *China*; 2. *Heilongjiang Fisheries Research Institute, CAFS, Harbin* 150070, *China*)

Abstract: 16 pairs of microsatellite primer were designed to characterize the genetic diversity within wild *Cyprinus carpio* and two cultivated stains, and the genetic relationship among them. The microsatellite data indicated that the average heterozygosity of three populations is 0.64, 0.40 and 0.38 respectively, demonstrating that the genetic diversity of wild common carp is the highest, and the frigid carp is more diversified than cold-tolerant strain of red carp resource. This reveled that the artificial propagation and selective breeding maybe decrease genetic diversity. In this study, one population specific marker 209bp was found, it laid the foundation for further research concentrating on the linkage between the traits and the marker, and for molecular assistant breeding in fish. The genetic distance of three populations was calculated and cluster analysis was also carried out. The phylogeny reconstructed by the microsatellites data conformed to the artificial propagation operation of the cultivated strains.

Key words: microsatellite; heterozygosity; *Cyprinus carpio*

黑龙江水产所运用常规育种和雌核发育技术相结合，相继培育出了荷包红鲤抗寒品系和高寒鲤两个品系。它们无论在形态、生长速度和抗性方面均优于亲本[1-3]。但是，人工杂交育种工作的开展和养殖实践(主要是自然水体、养殖水体环境恶化)是否造成生态位单一，是否导致种群多态性降低，是否会造成两选育品系优良性状退化等。目前，国内外对鲤科鱼类还没有这方面的研究报道。微卫星

收稿日期：2000－06－20

作者简介：杜长斌(1975－)，男，山东高唐人，硕士，研究方向为水产动物遗传育种，本校2000届硕士研究生毕业。

(Microsatellite)是指以少数几个核苷酸(多数为2~5个)为单位多次串联重复的DNA序列。微卫星分析分辨率高[4]、信息量大[5]和具有较高的信息质量,非常适用于亲缘关系很近物种的遗传分析。由于微卫星分子遗传标记多态性高且具共显性遗传,因而通过它计算杂合度可以较好地反映群体内的遗传变异。

1 材料和方法

1.1 材料

详见表1。

表1 野鲤和两选育品系背景介绍

Tab.1 The background description of common carp and two cultivated strain

种 类	采集地点	数量	起 源
黑龙江野鲤野生种	黑龙江省抚远县江段	20	野生种群
荷包红鲤抗寒品系选育种	黑龙江水产研究所民富实验基地	20	黑龙江野鲤、荷包红鲤的F2分离出的红鲤选育而成
高寒鲤选育种	黑龙江水产研究所松埔实验场	20	黑龙江野鲤、荷包红鲤、德国镜鲤和散鳞镜鲤选育而成

1.2 基因组DNA的提取

取鱼肝脏,液氮研磨至粉末,加入DNA提取液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 76 mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 5mmol/L EDTA)55~65℃温育3 h,加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提,取上清,加入二倍体积的无水乙醇沉淀,70%乙醇冲洗,自然风干,溶于适量的TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mmol/L EDTA)中,置于4℃冰箱备用。

1.3 PCR反应及扩增产物的分离

优化的微卫星PCR反应条件为25μL反应体系中含0.1ng基因组DNA,0.5μL(100mM) 3'和5'端引物详见表2,1U Taq DNA聚合酶(上海生工生物工程公司),18 μL PCR缓冲液。反应在PE9700型PCR扩增仪上进行,先经94℃预变性3~5 min后,进行25个扩增循环,每一循环包括92℃45s,52℃45s,72℃45s,最后在72℃延伸5~7 min。扩增产物在3.0%的琼脂糖凝胶中电泳,EB染色后用GDS8000型凝胶成像系统(UVP公司)观察并拍照。Marker(分子量标记)为Promega公司的100bp DNA Ladder。

表2 微卫星引物序列及其退火温度

Tab.2 Microsatellite primers sequence and its annealing temperature

位 点	引物序列	退火温度(℃)	位 点	引物序列	退火温度(℃)
MFW1	GTCCAGACTGTCATCAGGAG GACGTGTACACTGAGTCACGC	51	MFW21	AAGTCACGAGCGGTGAAGC ATGCCTCACTGTCGTTGTCTA	51.5
MFW2	TGCAAGCAGCCTGGCTCCCAG GATCTCAACTTTCCGTTACCTG	53	MFW22	GTTCTATAAACATACACGCTG CAAAAGGAACTGAGCATAGT	53
MFW4	TCCAAGTCAGTTTAATCACCG GGGAAGCGTTGACAACAAGC	51.5	MFW26	CCCTGAGATAGAAACCACCTG CACCATGCTTGGATGCAAAAG	51
MFW5	GAGATGCCTGGGGAAGTCAC AAAGAGACCGGGGTAAAGGAG	52	MFW27	GATCTAAAATATGGTGTGTG CATAATGCCTCTCATTAATC	5[illegible]
MFW6	GTTGAGATGACTCCTGTGGG ACGCACAGAAACGAAGACGC	52.5	MFW28	GATCCCTTTTGAATTTTTCTAG ACAGTGAGGTCCAGAAGTCG	49
MFW7	CGCACAGAAACGAAGACCCA AAAAGCTGAAGGCTAGACACG	53	MFW29	AGCGGTAGCTTCTCGGAACTG TCTGGAAATCCCTGAGCGAG	52.5
MFW9	GATCTGCAAGCATATCTGTCG ATCTGAACCTGCAGCTCCTC	51.5	MFW30	GGTCAACAAGTAGTTGTGCAG CCATCTCTGTCATTGCAACAG	52
MFW14	CAGAAGCTTCTGGAAATCTGAG GCGAGAAGATTGATGGACAAC	50.5	MFW32	CATTATTAAACGAGTTGTACAC GATCCCTGAACTTTTGAATGGC[illegible]	52.5

1.4 数据统计方法

生物遗传多样性的分析将微卫星分子遗传标记(电泳图谱中的每一条DNA片段)作为等位基因处

理。本文计算了每一群体每一微卫星位点的平均杂合度观测值 H_0，平均杂合度期望值 H_e，以考察群体内的遗传变异水平。并通过计算群体间等位基因的频率计算出群体间的遗传距离 D。用这些参数来考察群体间的遗传变异水平。有关的计算公式为：

群体的平均杂合度期望值 $H_e = \sum_{i=1}^{n}(1 - \sum_{j=1}^{i} X_j^2)/n$，其中，$Xj$ 为群体中第 i 个位点第 j 个等位基因的频率，n 为所测位点总数。

遗传相似性系数 $I = \sum_m \sum_i P_1 mi P_2 mi / \sqrt{\sum_m \sum_i P_1^2 mi \sum_m \sum_i P_2^2 mi}$

遗传距离 $D = -\ln I$，其中，i 为第 m 位点的第 i 个等位基因，$P_1 mi$ 是种群 1 第 m 个位点第 i 个等位基因的频率，m 为测定的位点总数。

多态位点比例 P = 多态性扩增片段数/扩增片段总数。

1.5　聚类分析

距离法分析采用 PHYLIP 3.5C 版本软件包中的“UPGMA”程序进行聚类。

2　结果

2.1　微卫星 PCR 结果

选择合成的 16 对微卫星引物(表 2)，有 11 对可以扩增出较好的谱带，其中有 7 对引物的扩增产物在三个群体间有多态性。扩增产物的大小范围为 47 ~ 246bp，等位基因大小差异范围为 199bp(表 3)。另外，引物 MFW1、MFW4、MFW9、MFW14 和 MFW28 扩增出了较为复杂的带(4 ~ 6 条)，这可能与其对应的微卫星位点具有较长的重复序列有关；其他引物扩增出的谱带较为一致。在 MFW26 位点(图 1)发现一长 209bp 的特异片段与高寒鲤和荷包红鲤紧密连锁，因微卫星是特异型扩增，因此，该标记具有进一步研究的必要。

表 3　野鲤和两个鲤鱼选育品系的遗传多样性

Tab.3　The genetic diversity of common carp and two cultivated strains

种群	微卫星位点											平均
	MFW1	MFW4	MFW5	MFW9	MFW14	MFW22	MFW26	MFW27	MFW28	MFW30	MFW32	
野鲤												
A	5	6	5	8	7	6	3	2	7	4	6	4.9091
B	52 ~ 156	61 ~ 175	48 ~ 60	104 ~ 183	101 ~ 142	223 ~ 242	182 ~ 199	202 ~ 203	111 ~ 150	57 ~ 71	49 ~ 67	
C	0.7012	0.7120	0.71	0.87	0.8042	0.74	0.6290	0.32	0.8340	0.72	0.74	0.6436
D	0.6778	0.7432	0.76	0.86	0.78	0.76	0.64	0.32	0.84	0.70	0.76	0.6512
荷包红鲤抗寒品系												
A	4	4	1	5	2	4	3	1	2	3	2	2.4545
B	55 ~ 181	57 ~ 156	60	132 ~ 243	179 ~ 187	234 ~ 246	191 ~ 209	204	139 ~ 144	76 ~ 87	76 ~ 81	
C	0.702	0.7025	0	0.6125	0.5	0.6650	0.325	0	0.4320	0.652	0.310	0.3817
D	0.66	0.6750	0	0.66	0.5	0.64	0.34	0	0.42	0.64	0.32	0.3523
高寒鲤												
A	5	5	2	5	4	2	3	3	2	2	3	2.8182
B	47 ~ 181	56 ~ 165	57 ~ 60	114 ~ 218	148 ~ 187	242 ~ 246	145 ~ 209	203 ~ 205	139 ~ 144	71 ~ 76	67 ~ 76	
C	0.7975	0.6545	0.25	0.825	0.59	0.2015	0.33	0.458	0.3192	0.3285	0.45	0.401
D	0.755	0.7090	0.32	0.81	0.66	0.18	0.34	0.46	0.32	0.32	0.46	0.416

注：A 代表“等位基因数”；B 代表“等位基因大小(bp)”；C 代表“杂合度观测值(H_o)”；D 代表“杂合度期望值(H_e)”。

2.2　遗传多样性分析

三群体的平均等位基因数、平均杂合度观测值与期望值见表 3。微卫星分析结果表明：黑龙江野鲤、高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系平均等位基因数分别为 4.91、2.82 和 2.45，平均杂合度观测值分别为

0.64、0.40和0.38；平均杂合度期望值分别为0.65、0.42和0.35(图2)。黑龙江野鲤、高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系的多态位点比例分别为0.39、0.30、0.28，表明野鲤的遗传多样性水平最高，高寒鲤次之，荷包红鲤抗寒品系最低。

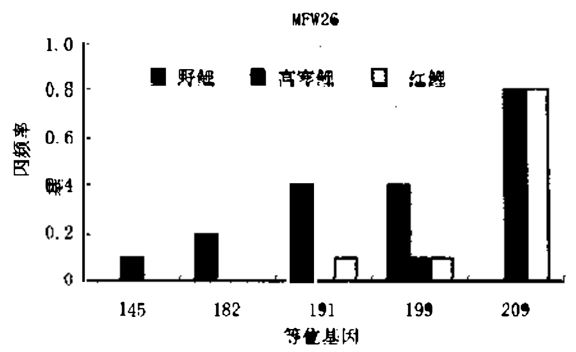

图1 引物MFW26的扩增结果

Fig.1 The PCR result of primer MFW26

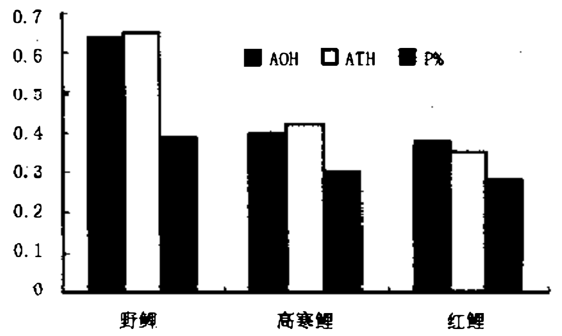

图2 多态性比较

Fig.2 Polymorphism comparison

2.3 聚类分析

根据黑龙江野鲤、高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系三群体各个微卫星位点的等位基因频率进行了遗传相似性指数(I)及遗传距离(D)的估算。三群体等位基因频率见图3。三群体遗传相似性指数和遗传距离见表4，由此表明三种群的遗传分化程度不高。用软件PHYLIC进行聚类分析，结果如图4所示。

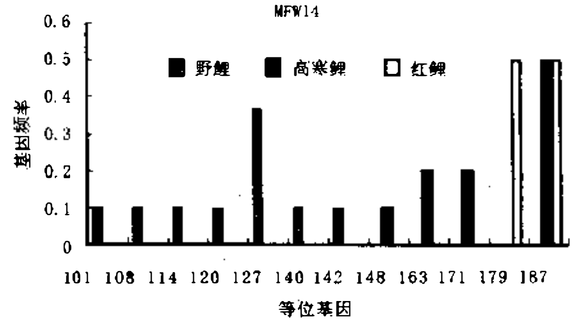

图3 部分点位的等位基因频率

Fig.3 The gene frequence in some microdatellite loci

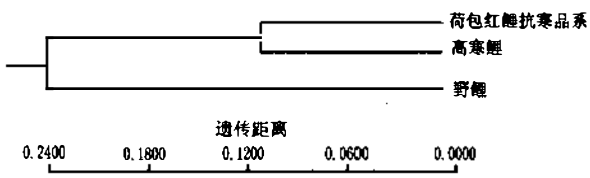

图4 野鲤和两个选育品系的亲缘关系聚类图

Fig.4 The constructed phylogenic dendrogram of common carp and two cultivated species using microsatellite results

3 讨论

生物群体的遗传多样性是评价物种资源状况的一个重要依据，它是物种适应多变的环境条件、维持长期生存和进化的遗传基础。目前，检测水生物种种质资源遗传多样性的手段主要采用同工酶技术和分子遗传标记技术。同工酶技

表4 野鲤和两个鲤鱼选育品系的Nei氏遗传距离

Tab.4 The Nei's genetic distance between common carp and two cultivated species

种类	野鲤	高寒鲤	荷包红鲤抗寒品系
野鲤	0.0000	0.8282	0.7808
高寒鲤	0.1885	0.0000	0.9176
荷包红鲤抗寒品系	0.2474	0.0851	0.0000

注：上三角矩阵(0.0000对角线)为平均同缘性矩阵；下三角矩阵(0 0000对角线)为Nei氏遗传距离。

术可以检测的多态位点较少，在很大程度上低估了整个基因组的遗传变异水平。如 Sumantadinata 和 Taniguchi[6]分别在 167 尾锦鲤和 167 尾相应野生型鲤鱼酶蛋白位点只能平均扩增出 1.261 和1.171个等位基因，其同工酶的异质性分别是0.047 和 0.042。而 Aliah 等[7]仅用 3 个微卫星位点对 10 尾锦鲤和 24 尾相应野生型鲤鱼扩增，分别平均出现了 2.3 和 6.0 个等位基因，其微卫星的异质性分别是 0.482 和 0.924。

王　强等用同工酶技术检测了黑龙江水系的不同野鲤群体的等位基因变异，发现野鲤的平均杂合度仅有 0.1355[8]，而微卫星分析结果野鲤的平均杂合度为 0.64，两者之间不但没有矛盾，恰恰证明了同工酶技术在检测种群异质性方面的不足之处。

从高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系的培育过程来看，似乎两者的平均杂合度应该远远高于野鲤，而微卫星分析结果却表明两者的平均杂合度大大低于野鲤的杂合度0.64，分别为 0.40 和 0.38。这至少有两方面的原因：一是高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系在人工培育过程造成了两者的异质性降低。因为在杂交组合配组和杂种选育配组的人工繁育过程中，无论在作亲本配合力实验筛选杂交优势组合或品种（品系）选育中都只选取少量优秀亲本，还是在对杂种后代选育或品种（品系）累代选育中都筛选具有典型性状的少量后代，这样就不可避免的造成了后代的多态性降低。二是长期的人工养殖实践，有可能造成生态位单一，导致原来具有多种遗传资源的高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系，在人为实践干预的单一单方向选择或简单的生态环境下（池塘养殖条件），维持生存和生长过分的依赖于环境而导致多态性降低和特定性状的丢失。本研究发现的 MFW26 位点的 209bp 的特异分子标记和微卫星分析得出的高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系亲缘关系较近都表明在两者之间具有共同的遗传基础，从 DNA 分子水平上重演了高寒鲤和荷包红鲤抗寒品系的培育过程。不少学者如沈俊宝和刘明华[3]、楼允东[9]已在鱼类育种方面做了很多工作，为用分子标记辅助育种奠定了基础。因此利用先进的微卫星分子标记技术，在 DNA 分子水平上鉴别不同的遗传差异和种群结构，有利于制定更加切实可行的育种路线，为数量性状的基因定位、为最终实现分子标记辅助育种提供便捷之路。

本研究的大部分工作是在中国水产科学研究院黑龙江水产研究所农业部北方鱼类生物工程育种重点实验室完成的，得到孙孝文和沈俊宝研究员等的热情指导，谨致谢忱。

参考文献：

[1]　刘明华，沈俊宝，白庆利，等．新品种高寒鲤的选育[J]．水产学报，1997，21(4)：391－397．
[2]　刘明华，沈俊宝，张铁齐．选育中的高寒鲤[J]．中国水产科学，1996，3(1)：10－19．
[3]　沈俊宝，刘明华．荷包红鲤抗寒品系的筛选[J]．淡水渔业，1988，3：314－317．
[4]　Tautz D，Renz M．Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryote genome[J]．Nucleic Acid Res，1984，12：263－270．
[5]　Tautz D．Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers[J]．Nucleic Acid Res，1989，17：6463－6471．
[6]　Sumantadinata K，Taniguchi N．Comparison of electrophoretic allele frequencies and genetic variability of common carp stocks from Indonesia and Japan[J]．Aquac，1990，88：263－271．
[7]　Aliah R S，Takagi M，Dong S，et al．Isolation and Inheritance of Microsatelllite Markers in the Common Carp Cyprinus carpio[J]．Fish Sci，1999，65(2)：235－239．
[8]　王　强，刘明华，张铁齐．黑龙江水系不同水体野鲤群体的等位基因变异[J]．中国水产科学，1996，3(1)：11－16．
[9]　楼允东．高邮杂交鲫及其亲本遗传性状的比较研究[J]．遗传，1992，14(4)：18－20．