

文章编号: 1674-5566(2010)03-0308-06

## 鲤易捕性状选育群体不同世代微卫星分析

池喜峰<sup>1,2</sup>, 贾智英<sup>1</sup>, 李池陶<sup>1</sup>, 石连玉<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 用 30 对微卫星引物对易捕性状人工选育鲤 (*Cyprinus carpio*) 的 4 个连续世代共计 154 个个体进行了遗传分析。4 个世代 ( $F_1$ — $F_4$ ) 的平均等位基因数分别为 7.761 9、6.918 9、5.088 9、4.666 7; 平均多态信息含量分别为 0.621 5、0.751 2、0.731 4、0.743 1; 平均观测杂合度分别为 0.773 0、0.713 5、0.759 3、0.719 6, 人工定向选育已对群体的多样性造成了影响。Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验及 F 检验数据显示人工累代选育已经使群体的遗传结构发生了变化, 并开始趋于稳定, 表现为偏离平衡的位点逐代增加, 相邻世代之间遗传分化系数逐代减小。F<sub>ST</sub> 平均值 0.099 5 提示出选育群体已处在中等分化水平, 有 90% 的遗传变异来自于群体内个体间。遗传距离及遗传相似性结果显示随着选育世代的增加, 世代之间遗传距离越来越小, 遗传相似性越来越大, 但与理论值仍有差距, 说明还有育种潜力, 应继续保持遗传效应, 确保育种成功。

**关键词:** 鲤; 选育群体; 微卫星; 遗传变异

**中图分类号:** S 917 **文献标识码:** A

## SSR analysis of selected high harvesting populations of common carp (*Cyprinus carpio*)

CHIXi-feng<sup>1,2</sup>, JIA Zhiming<sup>1</sup>, LIChi-tao<sup>1</sup>, SHILian-yu<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this research, 30 pairs of microsatellite primers were used to analyze the genetic variation of the selected populations in common carp (*Cyprinus carpio* L.). The average alleles of each generation ( $F_1$ — $F_4$ ) were 7.761 9, 6.918 9, 5.088 9, 4.666 7 respectively; the average Polymorphism Information Content values were 0.621 5, 0.751 2, 0.731 4, 0.743 1 respectively; and the average heterozygosity were 0.773 0, 0.713 5, 0.759 3, 0.719 6 respectively, which embodied that the directive breeding had affected the population's genetic diversity. The Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium and F-statistics indicated that the generations breeding had changed the genetic structure of the populations with the performance of increasing loci deviated from the equilibrium and decreasing genetic differentiation coefficient between the adjacent generations. F<sub>ST</sub> value (0.099 5) suggested the selected population had reached to medium differentiation and 90% of the genetic variation were distributed within populations. The result of genetic distance and genetic identity implied that the distance has become smaller between the adjacent generations.

收稿日期: 2009-09-22

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1204); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-49-05)

作者简介: 池喜峰 (1982-), 男, 硕士研究生, 专业方向为鱼类育种研究。E-mail: winner91@126.com

通讯作者: 石连玉, Tel: 0451-84861319, E-mail: sly2552@yahoo.com.cn

and the identity became greater but there was still a gap to the theoretical value so there was still potential for further selection. Therefore the artificial selection should be continued to obtain the final success of breeding program.

**Key words:** common carp; selected populations; microsatellite marker; genetic variation

鲤 (*Cyprinus carpio*) 是世界上主要养殖鱼类,特别是在亚、欧两洲的鱼类养殖中占有极其重要的地位。我国鲤的养殖历史悠久,如今它仍是我国的主要养殖品种。但是,除了池塘养殖外,一些大中型水库、湖泊的单产量均较低,原因是鲤属于底层鱼类,逃网能力强,回捕率低,通过增加放养量来提高养殖产量不能从根本上解决问题,只会造成人力、物力和财力的更大浪费。黑龙江水产研究所于 1983 年开始利用起捕率高的大头鲤 (*Cyprinus pellegrii pellegrii*) 和具有抗寒能力的黑龙江野鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*) 及生长快的德国镜鲤 (*Cyprinus carpio L. mirror*) 3 个亲本进行杂交选育,以期获得起捕率高、抗寒性强的鲤新品种。选育首先将德国镜鲤与大头鲤;德国镜鲤与黑龙江野鲤的两组亲本杂交,获得两组杂交子代,将这两组杂交子代杂交,获得一组杂交子代,再将此杂交子代与大头鲤回交获得了杂交第一代  $F_1$ ,  $F_1$  自交后选择能越冬且易起捕的为  $F_2$ , 如此选择直至  $F_4$ 。其他组合在选择过程中均被淘汰。

微卫星标记技术,亦称简单重复序列 (Simple Sequence Repeats SSR),具有简单易操作、快速、重复性好、信息量大,且以孟德尔共显性方式遗传的特点,已被广泛应用于生物学研究的各个领域,在鲤遗传多样性研究方面的报道也较多<sup>[1-5]</sup>。但对鲤连续选育世代微卫星标记分析尚未见报道。本文利用微卫星分子标记技术对易捕鲤  $F_1$  至  $F_4$  4 个世代的遗传信息进行连续跟踪,揭示选育群体的遗传变异,掌握其遗传结构的变化,从而为选育工作提供可靠的理论基础,确保选育工作顺利进行。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

4 代的样品均采自黑龙江水产研究所松浦实验站,其中  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $F_3$  均为经过起捕和抗寒程序选择的群体, $F_4$  是未经过越冬的群体。剪取鳍条迅速放于 75% 酒精中,带回实验室  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待

用。所采样品信息见表 1。基因组 DNA 的提取采用常规酚-氯仿法,并将其浓度调至  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

表 1 样本信息

Tab. 1 Information of samples

样本	起捕率 (%)	越冬成活率 (%)	采集数量 (尾)
$F_1$	89.26	72.71	21
$F_2$	90.91	84.62	37
$F_3$	96.49	98.28	45
$F_4$	—	—	51

### 1.2 微卫星引物

微卫星引物 MFW 系列来自 Crooijmans<sup>[6]</sup> 和 Tanck<sup>[7]</sup> 的文献,HLJ 系列来自侯宁<sup>[8]</sup> 的文献,对部分引物的退火温度做了调整。30 对引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 微卫星 PCR 扩增及产物的检测

反应体系:  $10\times\text{PCR buffer}$   $1.5\ \mu\text{L}$ ,  $10\text{ mmol/L dNTP}$   $0.3\ \mu\text{L}$  上下游引物各  $0.5\ \mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶  $0.075\ \mu\text{L}$ ,  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$  DNA 模板  $1\ \mu\text{L}$  加灭菌双蒸水至总体积  $15\ \mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序:  $94^{\circ}\text{C}$   $3\text{ min}$ ,  $94^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $53\sim 63.7^{\circ}\text{C}$  (视引物退火温度调整)  $30\text{ s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ , 25 个循环后,  $72^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ 。反应在德国 Biometra 公司的 TGRADIENT 型 PCR 仪上进行。

产物的检测: 扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染后再显色,扫描,保存电泳图谱,利用凝胶成像系统进行图像分析处理。

### 1.4 数据统计分析

根据电泳图谱来分析微卫星多态性变化。利用 Popgene<sup>32</sup> 软件计算群体平均观测杂合度 ( $H_0$ )、平均期望杂合度 ( $H_E$ )、 $\chi^2$  检验 Hardy-Weinberg 平衡、遗传相似性指数 ( $I_b$ )、Nei's 遗传距离 ( $D$ )、近交系数 ( $F_{IS}$ )<sup>[9]</sup>、遗传分化指数 ( $F_{ST}$ )。多态信息含量 ( $C_{PI}$ ) 由 Botstein 等<sup>[10]</sup> 提供的方法计算。

### 1.5 聚类分析

根据各世代间的 Nei's 遗传距离,用 MEGA 4.1

软件包<sup>[11]</sup>构建4个世代的UPGMA聚类图。

## 2 结果

### 2.1 PCR结果与群体的遗传多态性

30对微卫星引物对人工选育鲤4个连续世代共计154个个体进行了遗传分析,由于各个世代的样本数不等,因此计算了能表征各个世代的等位基因丰富度的平均等位基因数( $N$ ): $F_1$ 为7.7619, $F_2$ 为6.9189, $F_3$ 为5.0889, $F_4$ 为4.6667,从而用来表征各个世代的等位基因丰富度,等位基因片段长度在110~426 bp之间。图1为4个世代在位点HLJ379的扩增图谱。表2显示,所用30个微卫星标记4个连续世代的平均 $C_p$ 值分别为0.6215、0.7512、0.7314、0.7431,平均观测杂合度分别为0.7730、0.7135、0.7593、0.7196,平均期望杂合度分别为0.6847、

0.7872、0.7714、0.7802。HardyWeinberg平衡的卡方检验结果为:随着选育世代的增加,偏离平衡的位点数也在增加, $F_1$ 有7个位点偏离平衡, $F_2$ 有10个, $F_3$ 有11个, $F_4$ 有18个。

### 2.2 世代间群体遗传变化

群体的 $F$ 检验数据由表2和表3显示,随着选育世代的增加,群体间的 $F_{ST}$ 值逐渐减小,从开始的中等分化水平0.0986到最后的弱分化水平0.0398说明群体间的遗传分化在逐代减小,群体的遗传结构趋于稳定,且从 $F_{ST}$ 平均值(0.0995)来看,群体间的大部分遗传变异来自于群体内。 $F_{IS}$ 值<sup>[12]</sup>(近交系数,值大于零表示观测杂合子缺失,值小于零表明杂合子过剩,值等于1时表明杂合体完全缺失)的计算结果表明,就平均数而言4个世代除 $F_1$ 代表现杂合度过剩外其它世代均表现为一定程度的杂合子缺失。

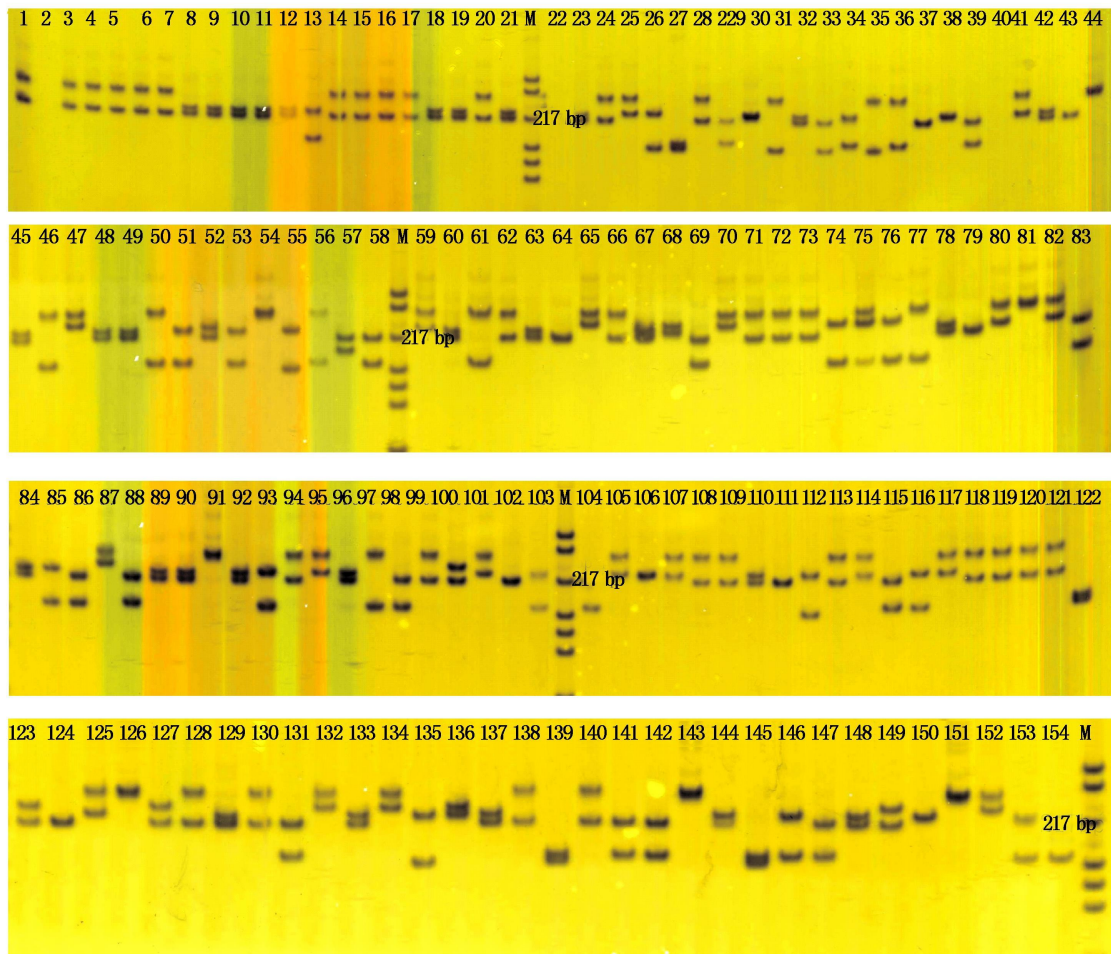


图1 位点HLJ379在4个世代的扩增图谱

Fig 1 Demonstration of microsatellite locus amplified by HLJ379 primer in the four generations  
1—21.  $F_1$ ; 22—58.  $F_2$ ; 59—103.  $F_3$ ; 104—154.  $F_4$ ; M: Marker(pBR322/MSP1).

表 2 4个世代的遗传多态性

Tab. 2 Parameters of genetic variability and F-statistics for the four generations

	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
N	7.761 9	6.918 9	5.088 9	4.666 7
H <sub>E</sub>	0.684 7	0.787 2	0.771 4	0.780 2
H <sub>0</sub>	0.773 0	0.713 5	0.759 3	0.719 6
C <sub>PI</sub>	0.621 5	0.751 2	0.731 4	0.743
F <sub>S</sub> 平均值	-0.158 5	0.086 6	0.008 1	0.072 6
F <sub>ST</sub> 所有群体	0.099 5			

表 3 4个世代间 F<sub>ST</sub>值比较Tab. 3 F<sub>ST</sub> values of pairwise comparison among the four generations

群体	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
F <sub>1</sub>				
F <sub>2</sub>	0.098 6			
F <sub>3</sub>	0.094 3	0.047 0		
F <sub>4</sub>	0.090 8	0.046 1	0.039 8	

注:  $0 < F_{ST} < 0.05$  为弱分化水平;  $0.05 < F_{ST} < 0.15$  为中等分化水平。

采用 Nei's方法计算 4个群体间校正遗传距离和遗传相似性,结果如表 4所示。随着选育世代的增加,群体间的遗传距离逐代减小,从 F<sub>1</sub> 与 F<sub>2</sub> 间的 0.800 1到 F<sub>3</sub> 与 F<sub>4</sub> 间的 0.302 7;遗传相

似性逐代增大,从 0.449 3增加到 0.738 8。利用遗传距离数值对 4个群体进行聚类分析,发现 F<sub>4</sub> 先与 F<sub>3</sub> 聚为一支后再与 F<sub>2</sub> 聚合,最后与 F<sub>1</sub> 聚合(图 2)。

表 4 4个世代间的遗传距离(对角线下方)和遗传相似性

Tab. 4 The genetic distance (below diagonal) and genetic identity in the four generations

群体	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
F <sub>1</sub>		0.449 3	0.497 8	0.506 5
F <sub>2</sub>	0.800 1		0.684 9	0.681 4
F <sub>3</sub>	0.697 5	0.378 4		0.738 8
F <sub>4</sub>	0.680 1	0.383 7	0.302 7	

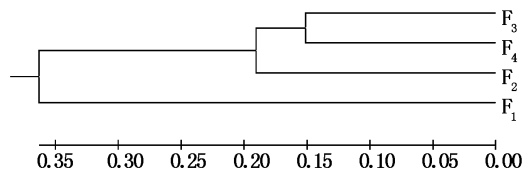


图 2 4个世代间的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA cluster graph of the four generations

### 3 讨论

#### 3.1 群体的遗传多样性

尽可能地维持种内遗传多样性,是持续利用种质资源的前提和基础,人工选育更要设法保证选育群体的遗传多样性,以保证选育工作进行和获得高质量的选育新品种。N、H<sub>0</sub> 和 H<sub>E</sub> 都是体现群体的遗传多样性的量度,数值越大基因

丰度越高。从本实验的结果来看,4个世代选育群体多样性都处于较高的水平,这是选育工作的必备前提,以使选育工作能够顺利进行,但随着选育世代的增加,由平均等位基因的计算结果显示,群体的遗传多样性有所下降。这提示人工选育的压力已经对选育群体的多样性造成影响,要保证选育工作的顺利进行,须完善选育措施,保证选育群体有足够的数量,从而使选育群体能够保持较高的遗传多样性水平。本研究 4个群体中平均多态信息含量从 0.621 5到 0.751 2均大于 Bostein等<sup>[10]</sup>提出衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标值 0.5,属于高度多态性座位,因此所得 C<sub>PI</sub>数据可以提供较为全面可靠的遗传信息供研究分析。

#### 3.2 群体的遗传变化

人工定向选育是一个复杂的过程,累代选育

的人工压力及人控环境势必会造成群体遗传水平的波动,因此要保证选育工作的顺利进行必须保持群体有足够的遗传变异水平<sup>[13]</sup>。意大利在引入日本对虾(*Penaeus japonicus*)后由于有效群体过小导致近交几率增加,使得第一代至第六代的杂合度下降了61.8%(同工酶检测)<sup>[14]</sup>。中国水产科学研究院黄海水产研究所<sup>[15]</sup>在对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的定向选育时为避免类似情况发生采取了一定措施保证足够大的有效亲本数量,基础群体至第六代的杂合度只下降了3.5%(微卫星检测),有效防止了近交。本实验杂合度的数据变化情况显示,选育群体并没有出现近交及瓶颈效应。从开始的 $F_1$ 观测杂合度就保持了较高的基数0.7730,到 $F_4$ 降至0.7196,只下降了6.9%。

通过对各个位点Hardy-Weinberg平衡的卡方检验发现,基因频率的观测值与理论值差异偏离平衡显著( $0.01 < P < 0.05$ )的位点由 $F_1$ 的12个递增到 $F_4$ 的20个,偏离极显著( $0 < P < 0.01$ )的位点也呈现逐代增加的趋势,由 $F_1$ 的8个递增到 $F_4$ 的18个,这种逐代加强的变化趋势除了人工选择压力的原因外也可能是由于样本量逐代增多导致采到的近缘个体增加的缘故,但这种偏离的结果可以表明选育群体的基因型频率发生了改变,说明经过人工定向4代的选育,群体的遗传结构已经发生了变化,体现了一定的人工定向选育效应,还发现有些位点在4代选育中都偏离平衡极显著,这可能就是与定向选育性状相关的分子标记,还有待进一步研究。群体遗传结构的改变还体现在微卫星图谱上一些位点的基因频率和基因型频率在4个世代中存在差异,还有一些位点低频等位基因的丢失。另外,在对各代 $F_{ST}$ 值配对比较后发现随着选育世代的增加,相邻世代之间的遗传分化系数呈明显的减小趋势,说明经过累代选育,选育群体的遗传结构趋于稳定,体现了人工定向选育的效应。 $F_{ST}$ 平均值0.0995提示出选育群体处在中等分化水平,且得出群体90%的遗传变异来自于群体内个体间,表明遗传结构的改变主要来自于人工选择的压力,这与选育的世代较短有关,也与选育过程中采取的措施有关。

一般而言,随着选育的进行,多代选育群体与初代群体间的遗传分化会越来越大。但本文

$F_1$ 与 $F_3$ 及 $F_4$ 间的分化指数和遗传距离,反而小于与 $F_2$ 间的分化指数和遗传距离,随着选育的进行,后代群体与初代群体的遗传相似性越来越高。分析原因这主要是由于实验样本量小造成的,例如 $F_1$ 的样本量小直接导致 $F_1$ 的多样性观测值低于 $F_2$ 的。

Thompson<sup>[16]</sup>指出同种群体间遗传距离在0.03~0.2之间,遗传相似性在0.8~0.97之间。张天时等<sup>[15]</sup>报道中国对虾群体经过6代选育,微卫星检测偏差校正后的遗传距离和遗传相似性分别为0.0377~0.2166和0.8093~0.9630表明了5个世代间遗传分化程度较低,而当安丽等<sup>[17]</sup>用AFLP对中国对虾群第9、10代选育群体检测后发现,两群体间的无偏遗传距离已降至0.0031,得出群体间出现趋同现象。颀晓勇等<sup>[18]</sup>用微卫星检测了吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)9代选育群体,测得偏差校正的遗传距离和遗传相似性指数分别为0.0581~0.0775和0.9254~0.9435,并指出群体间存在一定的遗传分化。本实验数据显示,随着逐代定向选择,遗传距离呈现逐代下降的趋势,从 $F_1$ 与 $F_2$ 之间的最大值0.8001降至 $F_3$ 与 $F_4$ 之间的最小值0.3207。遗传相似性呈现逐代递增的趋势,由 $F_1$ 与 $F_2$ 之间的最小值0.4493增至 $F_3$ 与 $F_4$ 之间的最大值0.7388。两者的变化趋势与理论推断完全吻合,但是,数值显示选育的结果与Thompson指出的数值还有差距,说明还有育种潜力,因此应继续保持遗传效应,保证育种成功。另外,经过UPGMA聚类的结果也可以清楚地看到4个世代的聚类情况:随着选育世代的增加,世代之间遗传距离越来越小,亲缘关系越来越近。进一步证明选育的结果是富有成效的。

#### 参考文献:

- [1] 杜长斌,孙效文,楼允东,等.应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选用品系的遗传多样性分析[J].上海水产大学学报,2000,9(4):285-289.
- [2] 马洪雨,岳永生,郭金峰,等.山东省三个鲤鱼养殖群体遗传多样性及亲缘关系的微卫星标记分析[J].湖泊科学,2006,18(6):655-660.
- [3] 常玉梅,孙效文,梁利群.中国鲤几个代表种群基因组DNA遗传多样性分析[J].水产学报,2004,28(5):482-486.
- [4] 全迎春,李大宇,曹鼎辰,等.微卫星DNA标记探讨镜鲤的种群结构与遗传变异[J].遗传,2006,28(12):1541-

- 1548.
- [5] 全迎春,孙效文,梁利群.应用微卫星多态性分析四个鲤鱼群体的遗传多样性[J].动物学研究,2005,26(6):595-602.
- [6] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Animal Genetics* 1997, 28: 129-134.
- [7] Tanck M W T, Palsta A P, Weerd M van de et al. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (*cyprinus carpio* L.) [J]. *Genome* 2001, 44(5): 743-751.
- [8] 侯宁,张岩,鲁翠云,等.微卫星 DNA 标记分析德国镜鲤的遗传潜力[J].遗传,2007,29(12):1509-1518.
- [9] Weir B S, Cockerham C C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure[J]. *Evolution* 1984, 38(6): 1358-1370.
- [10] Botstein D, White R L. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J of Hum Genet* 1980, 32(3): 314-331.
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Brief Bioinformatics* 2004, 5(2): 150-163.
- [12] Levene H. On a matching problem in genetics[J]. *Ann Math Stat* 1949, 20(1): 91-94.
- [13] Marc Vandeputte. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquatic Living Resources* 2003, 16(5): 399-407.
- [14] Sbordoni V, De Mattheis E, Cobolli Sbordoni M, et al. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Aquaculture* 1986, 57: 239-251.
- [15] 张天时,王清印,刘萍,等.中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)人工选育群体不同世代的微卫星分析[J].海洋与湖沼,2005,36(1):72-80.
- [16] Thorp J P. The molecular clock hypothesis, biochemical evolution, genetic differentiation and systematics [J]. *Annual Review of Ecology Systematic* 1982, 13(1): 139-168.
- [17] 安丽,刘萍,李健,等.“黄海 1号”中国对虾不同世代间的 AFLP 分析[J].中国海洋大学学报,2008,38(6):921-926.
- [18] 颌晓勇,李思发,蔡完其.吉富尼罗罗非鱼选育过程中遗传变异的微卫星分析[J].水产学报,2007,31(3):385-390.