

李建林, 李红霞, 唐永凯, 等. 利用微卫星标记分析 6 个鲤鱼群体的遗传差异 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 936-940.

LI J-L, LI H-X, TANG Y-K, et al. Genetic Diversity Analysis of Six Populations of Common Carp by Microsatellite Markers [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (9): 936-940.

利用微卫星标记分析 6 个鲤鱼群体的遗传差异

李建林, 李红霞, 唐永凯, 俞菊华, 董在杰

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为了评估和合理利用鲤种质资源, 选出 13 个微卫星位点对框镜鲤、黑龙江鲤、荷包红鲤、兴国红鲤、黄河鲤和建鲤进行遗传多样性分析。结果显示: 13 个微卫星位点在 6 个鲤鱼群体中共检测出 142 个等位基因, 所检测到的等位基因片段长度在 116~280 bp。各鲤鱼群体的平均观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 分别在 0.564~0.705 和 0.611~0.776; 13 个位点在 6 个鲤鱼群体中平均多态信息含量 (PIC) 在 0.573~0.749。固定系数 (FIS) 分析表明, 只有建鲤群体表现为杂合子过剩 (平均 $FIS < 0$), 其他 5 个鲤鱼群体表现为杂合子缺乏 (平均 $FIS > 0$)。试验结果表明, 这 6 个鲤鱼群体多态信息含量丰富, 遗传多样性水平较高, 具有较大的选育潜力。群体间的遗传距离和聚类分析显示, 框镜鲤与兴国红鲤亲缘关系最远, 黄河鲤与建鲤的亲缘关系最近。

关键词: 微卫星标记; 鲤; 群体; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标识码: A

Genetic Diversity Analysis of Six Populations of Common Carp by Microsatellite Markers

LI Jian-lin, LI Hong-xia, TANG Yong-kai, YU Ju-hua, DONG Zai-jie

(Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture/
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: For evaluation and rational utilization of the germplasm resources of Common carp, the genetic diversity of *Cyprinus carpio* L., *C. carpio haematopterus*, *C. carpio* var. *wuyuanensis*, *C. carpio* var. *singunensis*, *C. carpio haematopterus* Temminck et Schlegel and *C. carpio* var. *jian* were analyzed with 13 microsatellite markers. In total, 142 alleles were detected in the six populations of common carp by the 13 microsatellite loci, whose DNA fragment length ranged from 116 bps to 280 bps. The average heterozygosity observed (H_o) varied from 0.564 to 0.705, and the heterozygosity expected (H_e) varied from 0.611 to 0.776 respectively in the six populations. The average polymorphic information content (PIC) of the 13 loci in the 6 populations of common carp ranged from 0.573 to 0.749. The average fixation index (FIS) showed heterozygote excess only in the *C. carpio* var. *jian* population, but heterozygote deficiency in the other 5 populations. The results suggested that rich polymorphism information content, large genetic diversity and great potential for selective breeding lied in the six populations. The genetic distance between each populations of the six Common carp populations and the UPGAM dendrogram showed that *C. carpio* L and *C. carpio* var. *singunensis* were the farthest in relationship, and *C. carpio haematopterus* Temminck et Schlegel and *C. carpio* var. *jian* were the nearest.

Key words: Microsatellite markers; Common carp; Populations; Genetic diversity

鲤鱼 *Cyprinus carpio* 是我国养殖历史悠久、分布最广的重要淡水养殖鱼类, 在淡水养殖业中鲤鱼养殖产量占相当大的比重。我国鲤鱼养殖品种资

源丰富, 框镜鲤 *Cyprinus carpio* L、黑龙江鲤 *C. carpio haematopterus*、荷包红鲤 *C. carpio* var. *wuyuanensis*、兴国红鲤 *C. carpio* var. *singuo-*

收稿日期: 2012-07-06 初稿; 2012-08-01 修改稿

作者简介: 李建林 (1974-), 男, 副研究员, 研究方向: 鱼类遗传育种和生物技术 (E-mail: lij1@ffrc.cn)

通讯作者: 俞菊华 (1966-), 女, 研究员, 研究方向: 水生生物技术 (E-mail: yujh@ffrc.cn)

基金项目: 国家“863”计划项目 (2011AA100401); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903045); 现代农业产业技术体系建设专项 (nyeytx-49)

nensis、黄河鲤 *C. carpio haematopterus* Temminck et Schlegfl 和建鲤 *Cyprinus carpio* var. *jian* 等都是我国优良的鲤鱼养殖品种。近年来我国鲤鱼品种种质资源混杂，导致养殖经济性性状退化严重，如生长缓慢，抗病力差等，对它们进行的遗传多样性研究，将有利于其种质资源的遗传保护和合理利用，保持或提高优良经济性性状。

微卫星标记作为第二代遗传标记与其他遗传标记（如同工酶、RAPD、RFLP 等）相比，具有多态性频率高、检测容易、重复性好、共显性的孟德尔式遗传等优点，被广泛用于群体遗传分析、系谱认证、品种及亲子鉴定等研究中^[1-4]。随着近几年来鲤鱼微卫星分子标记的开发及利用的迅速发展，微卫星分子标记用于鲤鱼的遗传结构分析和辅助育种已有较多的报导。孙效文等^[5]分析了镜鲤 2 个繁殖群体的遗传结构，找到了与体质量相关的基因型。鲁翠云等^[6]用微卫星分子标记分析亲本的遗传结构并指导家系亲本的选配，获得了良好的选育效果。本试验采用微卫星标记技术分析 6 个鲤鱼群体的遗传多样性，以探讨这 6 个鲤鱼群体的遗传差异，为鲤鱼的遗传保护、持续利用和微卫星标记辅助育种提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验选取 6 个鲤鱼群体共 132 个样本，分别为框镜鲤 30 尾、黑龙江鲤 30 尾、荷包红鲤 24 尾、

兴国红鲤 14 尾、黄河鲤 25 尾和建鲤 24 尾，均取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。其中建鲤为淡水渔业研究中心选育保存品种，其他 5 种鲤鱼为原种地引进品种。剪取各品种样本的鳍条，用 95% 酒精保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 样本鳍条经蛋白酶 K 消化后，根据文献 [7] 的酚-仿法抽提总 DNA，用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性，后用紫外分光光度计检测 DNA 样品的浓度和纯度，稀释 DNA 至 50~100 ng·μL⁻¹，4℃ 保存备用。

1.2.2 引物合成及 PCR 反应 微卫星引物为中国水产科学研究院黑龙江水产研究所开发的镜鲤微卫星标记引物^[6]，由上海博尚生物技术有限公司合成。表 1 列出了经选择得到的 13 对在 6 种鲤鱼中都能扩增出清晰条带的引物序列和退火温度。PCR 反应总体积为 10 μL，其中含 10× 反应缓冲液 1.0 μL，2 mmol·L⁻¹ MgCl₂，200 μmol·L⁻¹ dNTP，0.1 μmol·L⁻¹ 引物，0.3 U Taq DNA 聚合酶，50~100 ng DNA，用灭菌双蒸馏水补足体积。PCR 反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 20 s，退火 20 s，72℃ 20 s，30 个循环；72℃ 延伸 8 min；4℃ 保存。

1.2.3 电泳及染色 PCR 产物用 8.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后，用硝酸银染色^[8]后拍照记录电泳结果。依照 marker 来判定扩增片段大小，并确定各个体的基因型。

表 1 13 对微卫星引物序列及其反应条件
Table 1 13 primer pair sequences and PCR reaction conditions

位 点	引物序列(5'-3')		退火温度/℃
HLJ392	F: ggctacaaggcaacactg	R: tgcggttaatgaggtctg	59
HLJ1097	F: ttgttagaacaccggctcaa	R: gctcccacggaagtgtgac	59
HLJ1113	F: tcgacgatcagccagataga	R: agttggccaggttgattt	55
HLJ1115	F: cgacgatcaagttaatgtgtcc	R: gacagcctatcccagtcga	58
HLJ1163	F: tggactgttaagaagggtatgtg	R: tgcttgggtactggatgaac	59
HLJ1211	F: tcctgcattctgagtgacagc	R: cagacattagccgggtagga	57
HLJ1285	F: gtgacgacagcgttagcatt	R: aacaagcgcaggctaatacat	60
HLJ1301	F: acacacctgcgctcactaaa	R: ttgtgtttcaggctacaaaagg	57
HLJ1316	F: aaacacagccagacatgcag	R: tgcttcaaatcaatccacaaa	60
HLJ1342	F: agaaacattgtggccgtgtt	R: ctgagctgacctcgtgtctg	60
HLJ1351	F: ccagtagagccctgtttcca	R: cgacgatcgagacagagaga	59
HLJ1438	F: ctgcccaacatcaacaagtg	R: catgcaaaactcaaggacat	58
HLJ1458	F: tgcattattgtgtccctcca	R: cacagcatgagcagaggaag	60

1.2.4 数据分析 根据每个个体产生的条带大小确定其基因型,并建立基因型数据矩阵,用 Cervus3.0 软件(<http://www.fieldgenetics.com/pages/home.jsp>)分析每一位点等位基因数(K)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)、群体内固定系数(FIS)、Hardy-Weinberg 平衡检测等参数信息;用 populations 软件(<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>)计算不同群体间的 D_A 遗传距离^[9];采用 MEGA5.1 软件(<http://www.megasoftware.net/>)根据遗传距离按非加权组对算数平均方差法(UPGMA)对不同鲤鱼群体进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 13 个微卫星位点扩增结果及多态性

本试验选择的 13 对微卫星引物在 6 个鲤鱼中均能扩增出清晰的条带,并且重复性好,PCR 产物通过 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可以清楚地分辨等位基因和基因型,图 1 为位点 HLJ1113 (b)、HLJ1301 (c) 和 HLJ1458 (d) 部分电泳结果。经统计分析,在 6 个鲤鱼中所检测到的等位基因大小在 116~280 bp,各位点在 6 个鲤鱼群体

中检测到的等位基因数为 4~19 个,共检测出 142 个等位基因,平均每个位点检测到等位基因数为 10.9 个,其中位点 HLJ1301 多态性最高,检测到了 19 个等位基因。

2.2 6 个鲤鱼群体遗传多样性

这 13 个微卫星位点在 6 个鲤鱼群体中均为多态性位点,在每个鲤鱼群体中的平均等位基因数在 5.8~8.6,各鲤鱼群体检测出的平均观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别在 0.564~0.705 和 0.611~0.776。13 个位点在 6 个鲤鱼群体中平均多态信息含量(PIC)在 0.573~0.749。在黄河鲤群体中,所检测到的平均等位基因数、平均期望杂合度和平均多态信息含量最高,分别为 8.160、0.776 和 0.749。群体内固定系数(FIS):只有建鲤群体的平均 $FIS = -0.011 < 0$,表现为杂合子过剩,其他 5 种鲤鱼平均 $FIS > 0$,表现为杂合子缺乏。对 6 个鲤鱼群体进行 Hardy-Weinberg 平衡检测,13 个位点中,框镜鲤有 2 个位点,黑龙江鲤有 8 个位点,荷包红鲤和建鲤有 4 个位点,兴国红鲤和黄河鲤有 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。13 个微卫星位点在不同鲤鱼中平均遗传参数如表 2 所示。

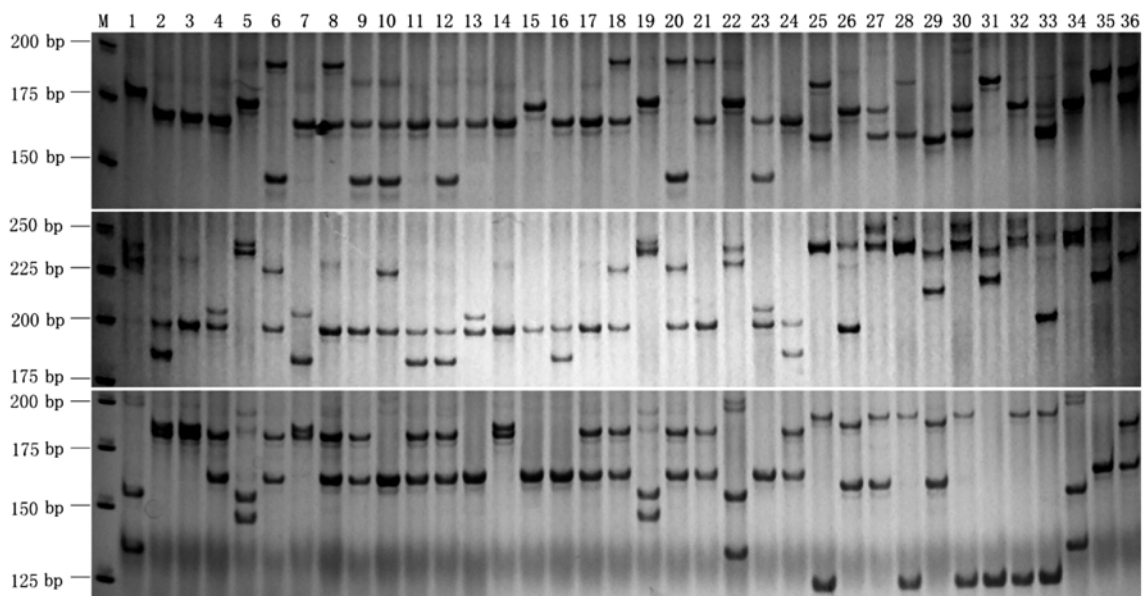


图 1 位点 HLJ1113 (a)、HLJ1301 (b) 和 HLJ1458 (c) 部分电泳结果

Fig. 1 Partial results amplified by HLJ1113 (a), HLJ1301 (b) and HLJ1458 (c)

注: M 为 25 bp DNA Step Ladder; 1~24 为黑龙江鲤; 25~36 为荷包红鲤

2.3 6 个鲤鱼群体间遗传差异

经 populations 软件计算得到 6 个鲤鱼群体之间的遗传距离(D_A)如表 3 所示,从表 3 可以看

出,6 个鲤鱼群体之间的遗传距离在 0.178 4~0.432 8,框镜鲤与兴国红鲤遗传距离最远,黄河鲤与建鲤之间的遗传距离最近。AMOVA 结果表

明，6 个鲤鱼群体的遗传分化系数 (F_{st}) 值在 0.079~0.220，平均为 0.134，说明有 13.4% 的遗传变异来源于群体间，86.6% 来源于群体内。根据群体间的遗传距离用 MEGA5.1 软件进行聚类分

析结果 (图 2) 表明：6 个鲤鱼聚类成 2 个大分枝，框镜鲤与黑龙江鲤组成 1 个大分枝，其他 4 种鲤鱼组成另一大分枝，从聚类分析中还可以看出框镜鲤与黑龙江鲤、建鲤与黄河鲤遗传关系最近。

表 2 13 个微卫星位点在 6 个鲤鱼群体中的平均遗传信息
Table 2 Average genetic information of the 13 microsatellite loci in six populations of Common carp

品 种	等位基因数	观察杂合度	期望杂合度	多态信息含量	固定系数
框镜鲤	6.692	0.564	0.611	0.573	0.050
黑龙江鲤	6.231	0.627	0.671	0.695	0.068
荷包红鲤	5.769	0.684	0.687	0.643	0.013
兴国红鲤	6.385	0.658	0.732	0.697	0.108
黄河鲤	8.615	0.699	0.776	0.749	0.120
建鲤	7.308	0.705	0.702	0.670	-0.011

表 3 6 个鲤鱼群体间遗传距离
Table 3 Genetic distance among six populations of Common carp

群体	框镜鲤	黑龙江鲤	荷包红鲤	兴国红鲤	黄河鲤
框镜鲤	—				
黑龙江鲤	0.3578	—			
荷包红鲤	0.3960	0.4582	—		
兴国红鲤	0.4328	0.3456	0.2752	—	
黄河鲤	0.3380	0.3131	0.2811	0.2561	—
建鲤	0.4202	0.3413	0.2996	0.2826	0.1784

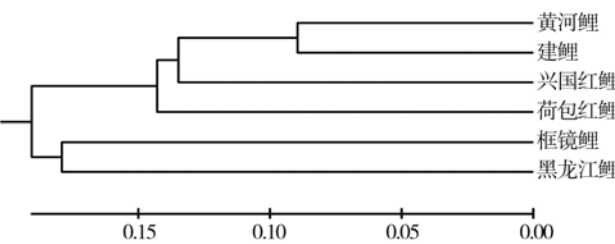


图 2 6 个鲤鱼群体 UPGMA 聚类分析结果

Fig. 2 UPGMA dendrogram among 6 populations of Common carp

3 讨论与结论

本研究所选择的 13 个微卫星标记在 6 个鲤鱼群体中都能稳定扩增出清晰条带，说明这 13 个位点在不同鲤鱼品种中适用性较好，能同时用于不同鲤鱼品种的遗传差异研究。这 13 个位点在 6 个鲤鱼群体中平均检测到的等位基因数为 4~19 个，根据微卫星选择标准，等位基因数大于 4 个才能较好地用于群体遗传多样性的评估^[10]，因此，这 13 个

微卫星标记都能较好地评估这 6 个鲤鱼群体的遗传多样性。

鱼类种群的遗传多样性分析对于探讨鱼类种群内及种群间的遗传差异、遗传保护、繁殖育种以及人类活动对鱼类基因库的影响等问题均有重要的参考价值。杂合度是度量种群遗传多样性程度的重要参数，本试验 6 个鲤鱼群体平均观察杂合度 (H_o) 分别在 0.564~0.705，Dewoody 等^[11]利用微卫星标记分析得出 13 种淡水鱼类的平均杂合度为 0.46，说明本试验的 6 个鲤鱼群体具有较高的杂合度。杂合度反映了群体遗传结构变异程度的高低，杂合度越高物种遗传多样性越丰富，对环境适应能力则越强^[12-13]。群体内固定系数 (F_{IS}) 反映了观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 之间的平衡关系， F_{IS} 值越接近零，基因型的分布越接近平衡状态。当 $F_{IS} > 0$ 时，表明杂合子缺乏， $F_{IS} < 0$ 时，表明杂合子过剩^[14]。本试验的 6 个鲤鱼群体平均 F_{IS} 值在 -0.011~0.120，基因型分布比较接近平衡状态，其中只有建鱼群体的平均 F_{IS} 值

(-0.011) 小于零, 表现为杂合子稍微过剩, 其他 5 种鲤鱼平均 FIS 大于零, 表现为杂合子缺乏。建鱼群体表现为杂合子稍微过剩, 这可能与建鲤是通过多系杂交和雌核发育技术相结合的综合育种技术人工育成的品种^[15]有关。根据 Bostein 等^[16]提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标, 当 $PIC < 0.25$ 时为低多态位点, 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态位点, 当 $PIC > 0.5$ 为高度多态位点。本试验中 13 个微卫星位点在 6 个鲤鱼群体中平均多态信息含量在 0.573~0.749, 除少数几个位点在一些群体中表现为中度多态外, 大多位点都为高度多态位点, 这也说明了这 6 个鲤鱼群体遗传多样性丰富, 有较大的遗传潜力和选育空间。结果还表明, 6 个鲤鱼中框镜鲤与兴国红鲤遗传距离最远, 黄河鲤与建鲤之间的遗传距离最近。通过了解不同鲤鱼品种之间的亲缘关系有助于通过杂交等育种方法进行鲤鱼品种遗传改良和选育新品系。

本试验所选择出的 13 个微卫星位点在框镜鲤、黑龙江鲤、荷包红鲤、兴国红鲤、黄河鲤和建鲤 6 个鲤鱼品种中适用性较好, 且都为多态性标记, 能较好地用于不同品种鲤鱼的遗传研究。本试验 6 个鲤鱼群体杂合度较高, 多态信息含量丰富, 遗传多样性水平较高, 具有较大的选育潜力。在这 6 个鲤鱼群体中, 框镜鲤与兴国红鲤亲缘关系最远, 黄河鲤与建鲤的亲缘关系最近。

参考文献:

- [1] PEREZENRIQUEZ R, TAKAGI M, TANIGUCHI N. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers [J]. *Aquaculture*, 1999, 173: 413-423.
- [2] 杜晓东, 高远镇, 邓岳文, 等. 利用微卫星标记进行马氏珠母贝家系遗传结构分析与系谱认证 [J]. *水产学报*, 2011, 35 (12): 1795-1804.
- [3] 刘海金, 朱晓琛, 孙效文, 等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15 (1): 30-37.
- [4] 刘博, 邵艳卿, 滕爽爽, 等. 乐清湾养殖缙蛭群体遗传结构的微卫星标记分析 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28 (2): 69-73.
- [5] 孙效文, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 镜鲤两个繁殖群体的遗传结构和几种性状的基因型分析 [J]. *水产学报*, 2007, 31 (3): 273-279.
- [6] 鲁翠云, 曹顶臣, 孙效文, 等. 微卫星分子标记辅助镜鲤家系构建 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15 (6): 893-901.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 463-471.
- [8] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法 [J]. *遗传*, 2002, 24 (3): 335-336.
- [9] NEI M, TAJIMA F, TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19: 153-170.
- [10] BARKER J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds [C] // *Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Canada: Guelph, Ontario, 1994, 21: 501-508.
- [11] DEWOODY J A, AVISE J C. Microsatellite variation in marine [J]. *J Fish Biol*, 2000, 56: 461-473.
- [12] 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *生物多样性*, 2003, 11 (3): 197-203.
- [13] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [14] WEIR B S, COCKERHAM C C. Estimation F-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, 38: 1358-1370.
- [15] 张建森, 孙小异. 建鲤新品系的选育 [J]. *水产学报*, 2007, 31 (3): 287-292.
- [16] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314-331.

(责任编辑: 林海清)