

微卫星标记分析大鳞鲃养殖群体的遗传结构及生长性状

鲁翠云, 耿龙武, 李 超, 程 磊, 孙效文, 徐 伟*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 大鳞鲃作为水产引进种, 受建群数量较小的影响其遗传资源相对有限, 因此在育种实践中有效地保护和利用现有的基因资源显得尤为重要。实验用 24 个微卫星标记分析了大鳞鲃养殖群体的遗传结构, 在随机采样的 96 个个体中共检测到 74 个等位基因, 各标记等位基因数为 2~5 个, 片段大小为 109~367 bp, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.144 5~4.626 4, 观测杂合度 (H_o) 为 0.135 4~1.000 0, 期望杂合度 (H_e) 为 0.126 9~0.788 1, 标记的多态信息含量 (PIC) 为 0.118 3~0.749 0, 平均为 0.428 1。统计结果显示, 大鳞鲃养殖群体处于中度多态水平; 经 χ^2 检验估计 Hardy-Weinberg 平衡, 结果表明, 大鳞鲃养殖群体处于平衡状态, 但有 8 个微卫星标记显著偏离了平衡。利用 SPSS 19.0 的 GLM 模型分析 24 个微卫星标记与体质量、体长、体高和体厚的相关性, 结果表明, B1、B20、B45、B51、B59、BC38 与 4 项生长性状均具有显著相关性, B26 与体质量、体高和体厚具有显著相关性, BC3 与体质量和体长具有显著相关性, 进而使用 Duncan 氏多重比较找到了每个微卫星标记具有生长性状优势的基因型。

关键词: 大鳞鲃; 微卫星标记; 遗传结构; 相关性

中图分类号: Q 785; S 917.3

文献标志码: A

大鳞鲃 (*Barbus capito*) 属于鲤科 (Cyprinidae)、鲃属, 原产于中亚的咸海, 是当地名贵的大型经济鱼类。由于过度捕捞和栖息环境遭到破坏, 大鳞鲃的野生资源量迅速下降, 已成为濒危物种。与中国鲃亚科鱼类相比, 大鳞鲃具有肉质鲜美、生长速度快、抗逆性强、耐盐碱等优良性状^[1]。2003 年, 为了改善盐碱水域养殖品种单一、缺少大型经济鱼类的现状, 黑龙江水产研究所将其野生个体引种到中国。经过几年的科学试验和研究, 基本实现了大鳞鲃的苗种驯化、人工繁殖和池塘养殖, 并规模化繁殖出 F_1 , 在大庆、肇东、天津等低洼盐碱水域进行了增养殖实验^[2]。近两年, 对大鳞鲃的研究主要集中在胚胎和苗种的盐碱耐受性^[3-4]、耗氧率^[5]等生物学指标的测定方面, 而遗传基础数据的积累相对较少。葛彦龙等^[6]分析了大鳞鲃 F_1 个体肝、肾、眼 3 种组织中的酯酶、淀粉酶、乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶 4 种

同工酶的差异, 结果发现 4 种同工酶具有明显的组织特异性, 以肝脏酶活性最高。

微卫星标记 (microsatellite) 以其保守性好、呈共显性遗传等特点, 成为研究群体遗传学和标记辅助育种的最佳选择。Geng 等^[7]用磁珠富集法开发了 20 个多态的微卫星标记, 并分析了大鳞鲃引进野生种质 15 个个体的遗传多态, 统计结果显示, 群体处于中等多态水平 ($H_o = 0.491$; $H_e = 0.381$), 以此为依据指导繁殖了大鳞鲃的 F_1 群体。实验用微卫星标记分析了大鳞鲃 F_1 养殖群体的遗传结构, 并分析了其与体质量、体长、体高和体厚 4 项生长性状的相关性, 以为大鳞鲃的遗传育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2010 年用 20 个微卫星标记对 15 尾引进的

收稿日期: 2013-03-11 修回日期: 2013-04-26

资助项目: 国家科技基础条件平台建设运行项目; “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD25B09); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (201007, 201108); 哈尔滨市科技攻关项目 (2012AA6CN037)

通信作者: 徐 伟, E-mail: xwsc23@tom.com

野生亲鱼进行遗传背景分析,根据个体亲缘关系构建 2 个繁殖配组。实验以其中 1 个繁殖配组的 F₁ 群体为实验材料,于 2012 年 8 月采自黑龙江水产研究所呼兰试验站,随机取样 96 尾,测量表型性状同时剪取鳍条样本。

1.2 表型性状的度量

根据中华人民共和国国家标准《养殖鱼类种质检测》第 3 部分性状测定(GB/T 18654.3 – 2008)进行体质量(BW)、体长(BL)、体高(BH)和体厚(BT)4 项表型性状的测量。用电子天平(精确到 0.01 g)采集体质量数据,电子游标卡尺(精确到 0.01 cm)采集体长、体高和体厚数据。

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

采用标准的酚、氯仿抽提法提取基因组

DNA,具体步骤参见《分子克隆实验指南》^[8]。大鳞鲃微卫星标记通过磁珠富集法获得^[7],引物由上海生工生物工程公司合成,引物信息见表 1。PCR 反应体系为 15 μL,包括 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP,微卫星上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板(50 ng/μL)2 μL,补无菌水到 15 μL。反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,52 ~ 62 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,25 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,0.1% 硝酸银染色显带。以 DL2000 (TaKaRa 公司)作为分子量标准,用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带的大小。

表 1 微卫星引物序列及扩增情况
Tab.1 Sequence and amplified result of microsatellite marker

标记 marker	正向引物序列(5'-3') forward primer sequence	反向引物序列(5'-3') reverse primer sequence	重复序列 repeat sequence	退火温度/℃ annealling temperature	片段长度/bp fragment size
B1	catttcgttgcctgtacct	acactgcggagtcacctct	(aatct) ₄	58	152 ~ 167
B8	aatgtgtctggcggaatag	acgacgactgtagagcttctg	(atcaga) ₄	58	349 ~ 367
B9	tggcactgtattgattgcac	tttgataaaaagcgtctgcc	(tta) ₇	58	235 ~ 242
B20	ctgccaccactgaatacct	ggcggaccacactttaagaa	(cacg) ₇ (ca) ₁₃	58	189 ~ 217
B26	ggagcattgtgggaatgaat	cgggaatgcaccattttagt	(ttc) ₈	58	194 ~ 221
B27	ttgcatttcgttgccttga	ttgatgcctccaaggttttc	(aatct) ₅	52	124 ~ 148
B32	ttcaccactgtttagtagtagg	cagatcgggacttctaagcg	(tg) ₁₀	60	298 ~ 345
B35	ggctgcatgattaaggctgt	cccccatgattgtaaagcac	(atga) ₇	60	133 ~ 140
B37	atttcccgaataatgcac	caaaattgaccagtgcctga	(att) ₇	60	226 ~ 234
B43	tctgctgtcaccgtaattc	ccttgggttttctgcctct	(gttta) ₄	58	222 ~ 260
B45	acacaagccgcgattaagac	tgcttttgcagttttgcg	(ca) ₁₀	60	112 ~ 127
B48	agagctccggtgtcaaggta	tgaagggtttgtagcatca	(ca) ₁₂	58	252 ~ 257
B51	tgcagaaacttcagttggacc	ggaattggccttactgttcc	(ta) ₁₇	60	145 ~ 165
B55	acgactgtggacatcagcac	tgccaaaaagaccctaaatc	(ac) ₁₃	60	144 ~ 152
B58	atategcccgccctatttt	aacaccactctctgttgggt	(tat) ₉	60	252 ~ 273
B59	atgccgtttcagttttgctt	ttccctgtctcctgtcctg	(tag) ₁₀	60	181 ~ 187
B64	tgacattcctgaagaaacagaa	tctgtgacctgtcctgttgc	(tcagaa) ₅	60	180 ~ 183
B68	tgtccaatgtaaaaacaagaaaa	cacaccacagttttcagecca	(aaat) ₅	60	109 ~ 113
BC3	gctcacatcacatcacagg	gcagcagacagacagcagac	(ca) ₇	62	197 ~ 202
BC8	atggcaggagaaacgatcac	ggttctacccgctcttacct	(ca) ₁₅	60	188 ~ 194
BC26	catcatcaccacagcagca	ttcagtcgcgtctcgtct	(tg) ₂₂	56	212 ~ 220
BC38	tggatgggtgattttgtgtg	gctcgcctttcatctgtctc	(ca) ₁₈	58	230 ~ 251
BC43	caatcatccctgcgagtgtga	gaggggatgtggcatttaga	(gt) ₈	58	155 ~ 169
BC51	cgacgatcatcaaaggtgag	ttacagaccagctgcacac	(ca) ₂₀	54	191 ~ 217

1.4 数据统计与分析

用“鱼类种质资源遗传分析平台(专利号: ZL200710144749.3)”将大鳞鲃个体的基因型

数据分别转换为 PopGene (Version 1.32) 和 GenePop (Version 4.1.4) 软件识别的数据格式。用 PopGene 软件统计微卫星标记的等位基因频

率 (allele frequency, P)、等位基因数 (observed number of alleles, N_o)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 以及期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)。用 GenePop 软件进行 χ^2 检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离。

多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 由 Botstein 等^[9] 公式计算:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \right)$$

式中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

用 SPSS 19.0 软件对实验群体的体质量、体长、体高和体厚性状进行正态分布检验, 再用 GLM 模块进行标记和性状的相关性分析, 模型如下: $y = u + g_i + e$, 其中 y 为性状, u 为群体均值, g_i

为第 i 个基因型的效应, e 为残差。采用 Permutation 检验确定基因型效应的显著性水平 (10 000 次), 对检测到的与性状显著相关的微卫星标记, 用 Duncan 氏多重比较分析基因型均值之间的差异。

2 结果与分析

2.1 表型性状分析

用 SPSS 19.0 的 Shapiro-Wilk 程序检验大鳞鲃群体的体质量 (BW)、体长 (BL)、体高 (BH) 和体厚 (BT) 性状的正态分布情况, 结果 4 项生长性状均显示出连续变异的特点, 符合正态分布。Person 相关性分析表明 4 项生长性状间具有极显著的相关性, 体质量和体高的相关性最大, 相关系数 (r) 为 0.973; 体长和体厚的相关性最小, 相关系数为 0.920 (表 2)。

表 2 体质量、体长、体高和体厚性状测量结果及性状间的相关系数
Tab.2 Measurement results and phenotypic correlation coefficients among body weight, standard length, body height, and body thickness

性状 traits	平均值 mean ± SD	偏度 skewness	峰度 kurtosis	最小值 minimum	最大值 maximum	P	相关系数 correlation coefficient		
							BW	BL	BH
BW/g	140.17 ± 31.89	0.08	-0.03	70.85	226.67	0.72			
BL/cm	23.58 ± 1.83	-0.43	-0.18	18.81	27.17	0.13	0.962 **		
BH/cm	4.00 ± 0.34	-0.22	-0.07	3.22	4.76	0.29	0.973 **	0.934 **	
BT/cm	3.18 ± 0.27	-0.36	0.10	2.54	3.85	0.16	0.966 **	0.920 **	0.962 **

注: ** 表示两个性状间极显著相关 ($P < 0.01$)。下面注释同此。
Notes: ** indicates highly significant correlation between the two tested traits ($P < 0.01$), the same as the following.

2.2 扩增结果

24 个微卫星标记在大鳞鲃养殖群体共 96 个个体获得了稳定、清晰的 DNA 条带, 并在个体间表现出不同程度的多态性。扩增片段大小为 109 ~ 367 bp, 各标记检测到的等位基因数为 2 ~ 5

个, 共检测到 74 个等位基因, 平均等位基因数 (N_o) 为 3.083 3 个。大鳞鲃群体中的部分个体在 B26 和 B27 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱如图 1 所示。

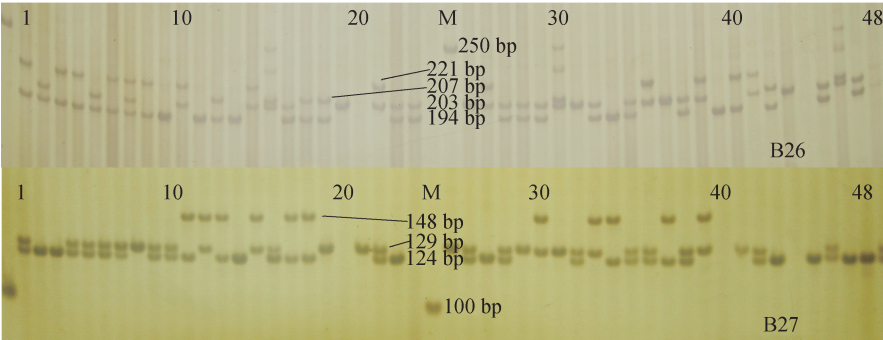


图 1 大鳞鲃部分个体 (1 ~ 48) 在微卫星座位 B26 和 B27 的 PAGE 电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis pattern of PCR product of partial individuals of *B. capito* at B26 and B27

2.3 大鳞鲃养殖群体遗传结构分析

大鳞鲃养殖群体 96 个个体在 24 个微卫星标记的有效等位基因数为 1.144 5 ~ 4.626 4, 平均值为 2.265 6; 观测杂合度为 0.135 4 ~ 1.000 0, 平均值为 0.538 4; 期望杂合度为 0.126 9 ~ 0.788 1, 平均值为 0.487 2; 多态信息含量为 0.118 3 ~ 0.749 0, 平均值为 0.428 1, 其中 8 个微卫星标记表现为中度多态 ($0.25 \leq PIC < 0.5$), 10

个微卫星标记表现为高度多态 ($PIC \geq 0.5$)。统计结果显示, 大鳞鲃养殖群体处于中度多态性水平 ($0.25 \leq PIC < 0.5$)。

群体 Hardy-Weinberg 遗传偏离。结果表明, 大鳞鲃养殖群体整体保持遗传平衡状态 (multi-loci test, $P = 1$), 但在 B1、B20、B32、B37、B45、B51、B68 及 BC43 8 个微卫星标记极显著偏离平衡 ($P < 0.01$) (表 3)。

表 3 大鳞鲃群体在 24 个微卫星标记的多样性参数及 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析

Tab. 3 Genetic diversity index and Hardy-Weinberg equilibrium analysis of 24 microsatellite markers for *B. capito*

标记 marker	等位基因数 N_o	基因型数 N_g	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	P_{HWE}
B1	3	3	1.577 6	0.439 6	0.368 2	0.335 3	0.008 3 **
B8	4	6	2.526 8	0.609 2	0.607 7	0.529 6	0.467 9
B9	2	2	1.206 3	0.188 9	0.172 0	0.156 4	1.000 0
B20	5	7	2.832 5	0.775 3	0.650 6	0.582 2	0.000 1 **
B26	4	7	3.235 5	0.755 6	0.694 8	0.633 9	0.169 1
B27	3	5	2.425 7	0.561 8	0.591 1	0.499 9	0.663 5
B32	4	5	3.363 4	1.000 0	0.706 5	0.650 3	0.000 0 **
B35	3	5	2.356 7	0.610 5	0.578 7	0.495 9	0.443 8
B37	2	2	1.519 3	0.437 5	0.343 6	0.283 4	0.005 2 **
B43	3	5	2.251 2	0.637 4	0.558 9	0.461 8	0.196 3
B45	4	6	3.420 5	0.947 4	0.711 4	0.649 9	0.000 0 **
B48	3	3	1.301 5	0.258 1	0.232 9	0.216 7	1.000 0
B51	5	9	4.626 4	0.397 8	0.788 1	0.749 0	0.000 0 **
B55	3	5	2.564 3	0.547 4	0.613 3	0.538 0	0.394 4
B58	4	7	3.354 1	0.771 7	0.705 7	0.644 4	0.561 5
B59	2	2	1.217 0	0.197 9	0.179 3	0.162 5	0.591 7
B64	2	2	1.144 5	0.135 4	0.126 9	0.118 3	1.000 0
B68	2	2	1.633 5	0.526 3	0.389 9	0.312 6	0.000 3 **
BC3	2	3	1.981 0	0.445 7	0.497 9	0.372 6	0.398 9
BC8	2	2	1.296 9	0.263 7	0.230 2	0.202 8	0.350 7
BC26	3	5	2.542 0	0.634 4	0.609 9	0.523 1	0.328 9
BC38	2	2	1.192 5	0.177 1	0.162 2	0.148 3	1.000 0
BC43	4	3	2.364 3	1.000 0	0.580 3	0.489 2	0.000 0 **
BC51	3	4	2.440 1	0.602 2	0.593 4	0.518 0	0.735 8
均值 mean	3.083 3	4.250 0	2.265 6	0.538 4	0.487 2	0.428 1	—

2.4 微卫星标记与性状相关性分析

24 个微卫星标记在 96 个个体中共检测到 102 种基因型, 每个位点的基因型数为 2 ~ 9 个。使用 SPSS 19.0 软件的 GLM 模型检验 24 个微卫星标记与体质量、体长、体高和体厚性状的相关性, 结果发现 8 个微卫星标记与各性状具有显著的相关性。微卫星标记 B1、B20、B45、B51、B59 和 BC38 与体质量、体长、体高和体厚均具有显著的相关性 ($P < 0.05$), 其中 B1 与 4 项生长性状的相关性达到极显著水平 ($P < 0.01$), B59 与体高性状的相关性达到极显著水平 ($P < 0.01$), BC8

与体长性状的相关性达到极显著水平 ($P < 0.01$); B26 与体质量、体高和体厚具有显著的相关性 ($P < 0.05$); BC3 与体质量和体长具有显著相关性 ($P < 0.05$)。

以某标记的某基因型表型性状均值显著高于其他基因型的表型均值, 并高于总体均值为优势基因型的判定标准。通过对不同基因型对应的生长性状进行多重比较 (Duncan 氏法), 结果在 8 个与性状显著相关的微卫星标记中获得 18 个性状优势基因型。B1 的基因型 BB (162/162), B20 的基因型 AE (217/189)、BE (203/189)、EE (189/

189)和CE(199/189),B45的基因型BD(119/112)和CD(117/112),B51的基因型AB(165/162)、BE(162/145)和AA(165/165),B59的基因型BB(181/181)以及BC38的基因型BB(230/230)在体质量、体长、体高和体厚4项生长指标均表现出显著的优势,为性状优势基因型。B26的基因型AD(221/194)、DD(194/194)、AC(221/203)和CC(203/203)在体质量、体高和体厚3项生长指标表型出显著的优势,为性状优势基因型;BC3的基因型AB(202/197)和AA(202/202)在体质量和体长表现出显著的优势,为性状优势基因型(表4)。

表 4 8 个微卫星标记不同基因型个体生长性状的平均值和多重比较
Tab.4 Means and multiple comparisons of four growth-related traits with different genotype in eight microsatellite markers

标记 marker	基因型 genotype	个体数 number	体质量/g body weight	体长/cm body length	体高/cm body height	体厚/cm body thickness
B1	BB	51	147.36 ± 30.59 ^b	23.99 ± 1.63 ^b	4.08 ± 0.32 ^b	3.25 ± 0.25 ^b
	AB	24	138.58 ± 25.99 ^b	23.52 ± 1.76 ^b	3.98 ± 0.29 ^b	3.16 ± 0.21 ^b
	BC	21	117.90 ± 32.77 ^a	22.31 ± 2.05 ^a	3.77 ± 0.39 ^a	3.00 ± 0.31 ^a
B20	BE	37	147.01 ± 28.02 ^{ab}	24.02 ± 1.67 ^b	4.08 ± 0.31 ^{ab}	3.23 ± 0.22 ^{ab}
	BB	16	123.66 ± 33.30 ^{ab}	22.70 ± 2.09 ^{ab}	3.82 ± 0.36 ^a	3.03 ± 0.30 ^a
	BD	13	139.86 ± 24.54 ^{ab}	23.72 ± 1.45 ^{ab}	4.01 ± 0.24 ^{ab}	3.18 ± 0.21 ^{ab}
	AE	11	156.38 ± 35.06 ^b	24.32 ± 1.62 ^b	4.19 ± 0.31 ^b	3.35 ± 0.25 ^b
	DE	9	115.08 ± 40.48 ^a	21.96 ± 2.30 ^a	3.70 ± 0.45 ^a	2.98 ± 0.38 ^a
	CE	6	143.04 ± 20.69 ^{ab}	23.74 ± 0.94 ^{ab}	4.03 ± 0.26 ^{ab}	3.27 ± 0.15 ^{ab}
	EE	4	146.03 ± 31.54 ^{ab}	23.87 ± 1.74 ^{ab}	4.04 ± 0.38 ^{ab}	3.25 ± 0.29 ^{ab}
B26	CD	21	137.08 ± 30.09 ^{ab}		3.96 ± 0.33 ^{ab}	3.16 ± 0.29 ^{ab}
	AC	15	144.83 ± 33.61 ^{ab}		4.05 ± 0.36 ^{ab}	3.22 ± 0.27 ^{ab}
	AD	15	149.33 ± 33.16 ^b		4.13 ± 0.33 ^b	3.26 ± 0.27 ^b
	CC	14	143.84 ± 26.94 ^{ab}		4.03 ± 0.31 ^{ab}	3.22 ± 0.18 ^{ab}
	BD	11	119.79 ± 35.78 ^a		3.78 ± 0.37 ^a	2.99 ± 0.30 ^a
	DD	10	149.18 ± 32.23 ^b		4.10 ± 0.37 ^b	3.26 ± 0.28 ^b
	BC	10	128.05 ± 24.92 ^{ab}		3.88 ± 0.26 ^{ab}	3.10 ± 0.19 ^{ab}
B45	AB	33	139.16 ± 27.61 ^{ab}	23.72 ± 1.69 ^{ab}	3.98 ± 0.31 ^{ab}	3.16 ± 0.23 ^{ab}
	BD	28	154.46 ± 31.26 ^b	24.21 ± 1.49 ^b	4.16 ± 0.31 ^b	3.31 ± 0.24 ^b
	AD	15	125.68 ± 34.03 ^{ab}	22.67 ± 2.20 ^{ab}	3.84 ± 0.36 ^{ab}	3.04 ± 0.29 ^a
	CD	8	148.19 ± 21.90 ^{ab}	23.98 ± 1.09 ^{ab}	4.12 ± 0.25 ^b	3.30 ± 0.16 ^b
	AC	7	123.30 ± 31.47 ^a	22.64 ± 2.05 ^{ab}	3.84 ± 0.37 ^{ab}	3.08 ± 0.31 ^{ab}
	DD	5	119.01 ± 44.48 ^a	22.21 ± 2.66 ^a	3.76 ± 0.50 ^a	3.03 ± 0.40 ^a
B51	EE	16	133.54 ± 37.46 ^{ab}	23.00 ± 2.10 ^b	3.94 ± 0.43 ^{ab}	3.12 ± 0.34 ^b
	AA	16	142.50 ± 32.06 ^b	23.69 ± 1.99 ^b	4.02 ± 0.32 ^b	3.20 ± 0.23 ^b
	AB	15	151.16 ± 28.91 ^b	24.20 ± 1.43 ^b	4.14 ± 0.26 ^b	3.29 ± 0.22 ^b
	BE	14	150.73 ± 27.56 ^b	24.20 ± 1.48 ^b	4.11 ± 0.32 ^b	3.28 ± 0.24 ^b
	CC	13	136.98 ± 33.26 ^b	23.46 ± 1.97 ^b	3.96 ± 0.36 ^{ab}	3.15 ± 0.28 ^b
	DD	9	140.36 ± 30.97 ^b	23.70 ± 1.70 ^b	4.01 ± 0.32 ^b	3.19 ± 0.24 ^b
	BD	6	134.04 ± 30.30 ^{ab}	23.31 ± 1.61 ^b	3.95 ± 0.35 ^{ab}	3.17 ± 0.28 ^b
	AE	4	121.89 ± 27.04 ^{ab}	23.04 ± 1.73 ^b	3.79 ± 0.28 ^{ab}	2.98 ± 0.23 ^{ab}
	BB	3	92.84 ± 31.09 ^a	20.34 ± 2.16 ^a	3.53 ± 0.44 ^a	2.78 ± 0.34 ^a
B59	BB	77	144.09 ± 30.35 ^b	23.80 ± 1.68 ^b	4.05 ± 0.32 ^b	3.22 ± 0.25 ^b
	AB	19	124.29 ± 33.85 ^a	22.66 ± 2.16 ^a	3.82 ± 0.37 ^a	3.06 ± 0.31 ^a
BC3	AB	41	146.41 ± 31.45 ^b	23.91 ± 1.79 ^b		
	AA	32	143.59 ± 30.09 ^{ab}	23.80 ± 1.58 ^{ab}		
	BB	23	127.70 ± 31.43 ^a	22.85 ± 1.95 ^a		
BC38	BB	79	143.93 ± 30.04 ^b	23.80 ± 1.68 ^b	4.04 ± 0.32 ^b	3.22 ± 0.25 ^b
	AB	17	122.70 ± 35.27 ^a	22.54 ± 2.17 ^a	3.83 ± 0.40 ^a	3.04 ± 0.31 ^a

注:同一栏中不同上标字母表示数值间差异显著($P < 0.05$)。
Notes: Values with different superscripts in the same column mean significant difference($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 大鳞鲃群体的遗传结构

大鳞鲃是威海的名贵经济鱼类,由于过度捕捞和栖息环境受到破坏,近几年资源量迅速下降,在当地已列入濒危物种名单。鉴于大鳞鲃生长速度快、耐盐碱能力强,中国于 2003 年从乌兹别克斯坦引进野生大鳞鲃鱼种 50 尾,经过一系列的摸索和研究,实现了由驯化、养殖到苗种的全人工繁殖,至 2011 年,已培育苗种 20 余万尾^[2],可以预见,下一步的研究重点将放在 F_1 后备亲鱼的选择和培育。大量的研究表明,受建群效应和人工选择的影响,中国主要水产养殖鱼类的养殖群体较野生群体的遗传多样性有不同程度的下降,张志伟等^[10]的研究结果表明,草鱼养殖群体在 10 个微卫星座位平均有 40% 的等位基因丢失,其期望杂合度平均值也显著低于野生群体;而引种到美国、匈牙利和日本的草鱼群体的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量的均值($A_R = 4.111$; $H_O = 0.465$; $H_E = 0.574$; $PIC = 0.511$)显著低于原种地的长江、黑龙江和珠江的群体($A_R = 4.788$; $H_O = 0.504$; $H_E = 0.631$; $PIC = 0.571$) ($P < 0.05$)^[11]。由于群体的遗传多样性降低而引发的种质性状衰退现象已备受关注,在育种实践中有意识地保护群体的遗传多样性是优良种质持续利用的前提和保障。

实验用 24 个微卫星标记分析了大鳞鲃养殖群体 F_1 的遗传结构,结果发现,养殖群体平均等位基因数($N_e = 3.083$)极显著高于平均有效等位基因数($A_e = 2.265$) ($P < 0.01$),表明 F_1 群体还没有受到选择的影响,保持了丰富的稀有等位基因;群体平均观测杂合度($H_O = 0.538$)高于期望杂合度($H_E = 0.487$),差异没有达到显著水平 ($P = 0.097$),证明虽然个体数较少,但是遗传资源相对丰富和稳定;杂合度位于 0.5 左右说明群体处于 Hard-Weinberg 平衡状态,卡方检验也体现出这一点,仅 8 个微卫星标记偏离了平衡,占 33.33%;群体的多态信息含量(PIC)是群体遗传多样性的直观体现,按照 Botstein 等^[9]的划分标准,大鳞鲃 F_1 群体处于中度多态性水平($0.25 \leq PIC = 0.428$ $1 < 0.5$),遗传多样性较好,具备进一步生产及选育优良种质的潜力。至于 F_1 群体的平均杂合度高于 Geng 等^[7]在亲本的检测结果

($H_O = 0.491$; $H_E = 0.381$),可能与所用的微卫星标记的多态性不同有关。由于所用原种的亲本数量非常少($n = 15$),基因资源相对有限,在遗传育种中增加了近亲交配的风险,因此,在大鳞鲃今后的选育过程中要注意对群体的遗传多样性进行有效的保护和利用。

3.2 性状相关性标记的筛选及利用

在群体、家系或个体选择中使用了基因或标记并最终能形成品种的育种技术均可称之为分子育种技术^[12],因此,开展分子育种的前提是获得与性状相连锁的基因或标记,近几年,在基因组和转录组水平上寻找与性状相关的标记成为主要经济鱼类研究热点,而单标记分析法以其简单、快速、有效的特点成为广泛采用的方法之一,通过比较不同标记基因型数量性状均值是否存在显著差异,来发掘与数量性状具有连锁关系的标记。鱼类的体质量、体长、体高和体厚均为典型的数量性状,也是主要的生长性状,鲤(*Cyprinus carpio*)^[13-15]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[16-17]、罗非鱼^[18]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[19]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[20]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[21]等经济鱼类已经用单标记分析法在基因组和功能基因中筛选了相关的分子标记,主要为微卫星标记和 SNP 标记。实验分析了 24 个微卫星标记与大鳞鲃 F_1 群体生长性状的相关性,结果获得了 8 个与主要生长性状显著相关的标记,其中 BC8 与性状的相关性达到了极显著水平 ($P < 0.01$),为大鳞鲃后备亲鱼的选择和配组提供了指导。

性状相关标记在育种实践中的应用途径是对性状优势基因型或等位基因的富集,孙效文等^[22]在镜鲤繁殖群体中筛选到 3 个与体质量显著相关的微卫星标记(HLJ302; HLJ383; HLJ343),进一步研究发现其子代群体中,体质量极大的个体其优势基因型的富集较体质量极小的个体多 1.4 倍,对于优良个体的选择具有一定的指导作用^[23]。Fuji 等^[24]用 50 个微卫星标记在牙鲆抗 LD 回交群体中获得 1 个与抗 LD 紧密连锁的微卫星标记(Poli.9-8TUF),进而发现在该位点扩增片段长度为 147 bp 的个体具有较强的抗病性,以富集该等位基因的杂合子代个体建立的抗 LD 群体(LD-R⁺) 在 2 个养殖场的发病率均为 0,而对

照群体 (LD - R⁻) 的发病率分别为 4.5% 和 6.3%^[25]。可见,使用少量性状相关的标记,将具有性状优势的等位基因或基因型在育种群体中富集,能够显著提高育种群体的生产性能。实验以某标记的某基因型表型性状均值显著高于其他基因型的表型均值,并高于总体均值为优势基因型的判定标准,在 8 个与性状显著相关的微卫星标记中获得 18 个性状优势基因型。这些优势基因型的获得能够用于指导大鳞鲃的繁殖配组,在苗种生产过程中,利用孟德尔遗传分离规律,将一个或几个具有显著性状优势的基因型富集到一个群体中,结合表型选择,能够快速获得生产性能优良的新品系。

3.3 标记指导引进种质的遗传育种策略

用于水产养殖目的的引进种质,其来源主要有 2 种,一是直接采集的野生种质,虽然数量不多,而本身遗传多样性较为丰富,但缺陷在于引种后的人工饲养过程中会有部分个体死亡,最终获得的可用于繁殖的有效亲本数量更少;二是经由商业购入的苗种,虽然引进的数量比较大,但是其遗传背景不清,可能仅为来源于几个家系的苗种。这两种来源的引进种质均由于有限的遗传资源,而在育种实践中存在极高的近亲交配风险,从而引发遗传退化、病害频发并造成了巨大的经济损失。有鉴于此,在大鳞鲃等引进种质开展分子标记指导的选择育种更为迫切,具体操作中应采取以下策略:一方面要尽可能地保护种质的遗传多样性,使用 20 个左右微卫星标记从基因组的水平上评估亲本个体的遗传差异,选择亲本间遗传距离适中的个体作为候选的繁殖配组,最大限度地避免了近亲繁育;另一方面要尽可能地富集性状优势基因型,利用几个标记优势基因型的富集达到最佳的培育目的。

参考文献:

- [1] 蔺玉华,王信海,耿龙武,等. 大鳞鲃 (*Barbus capito*) 的含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 天津师范大学学报:自然科学版,2008,28(3):1-4.
- [2] 徐伟,耿龙武,苗建生,等. 耐盐碱鱼类大鳞鲃的研究现状[J]. 天津农学院学报,2012,19(3):62-64.
- [3] 徐伟,耿龙武,李池陶,等. 大鳞鲃的人工繁殖、胚胎发育和耐盐碱测定[J]. 水产学报,2011,35(2):255-260.
- [4] 耿龙武,徐伟,李池陶,等. 盐碱对大鳞鲃血清渗透压、离子含量及鳃丝 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响[J]. 中国水产科学,2011,18(2):458-465.
- [5] 耿龙武,徐伟,李池陶,等. 大鳞鲃耗氧率和窒息点的测定[J]. 上海海洋大学学报,2012,21(3):363-367.
- [6] 葛彦龙,徐伟,耿龙武. 大鳞鲃同工酶的研究[J]. 水产学杂志,2011,24(4):59-61.
- [7] Geng L W, Lu C Y, Tong G X, et al. Development and characterization of twenty microsatellite markers for the endangered fish *Luciobarbus capito* [J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(4):865-867.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2002:96-99.
- [9] Botstein D, White R I, Skolnich M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3):314-331.
- [10] 张志伟,曹哲明,杨弘,等. 草鱼野生和养殖群体间遗传变异的微卫星分析[J]. 动物学研究,2006,27(2):189-196.
- [11] Chen Q, Wang C H, Lu G Q, et al. Microsatellite genetic diversity and differentiation of native and introduced grass carp populations in three continents [J]. Genetica, 2012, 140(4-6):115-123.
- [12] 孙效文,鲁翠云,贾智英,等. 水产动物分子育种研究进展[J]. 中国水产科学,2009,16(6):981-990.
- [13] 储志远,张晓峰,曹柱,等. 鲤回交群体的 4 种生长性状的相关性分析[J]. 水产学报,2011,35(1):10-19.
- [14] 张义凤,张研,鲁翠云,等. 鲤鱼微卫星标记与体重、体长和体高性状的相关分析[J]. 遗传,2008,30(5):613-619.
- [15] 俞菊华,李红霞,李建林,等. 建鲤 *FABP3* 基因分离及其多态性与增重的相关分析[J]. 水产学报,2012,36(12):1809-1818.
- [16] 王解香,白俊杰,于凌云. 草鱼 EST-SSRs 标记的筛选及其与生长性状相关分析[J]. 淡水渔业,2012,42(1):3-8.
- [17] 曹婷婷,白俊杰,于凌云. 草鱼醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 水产学报,2012,36(4):481-488.
- [18] 刘福平,白俊杰,宋红梅,等. 尼罗罗非鱼微卫星标记与主要生长性状的相关性分析[J]. 水产学报,2010,34(2):169-177.

- [19] 王桂兴,刘永新,孙效文,等. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关性分析[J]. 东北农业大学学报,2009,40(7):77-84.
- [20] 于凌云,白俊杰,樊佳佳,等. 大口黑鲈肌肉生长抑制素基因单核苷酸多态性位点的筛选及其与生长性状关联性分析[J]. 水产学报,2010,34(6):845-851.
- [21] 王美玉,刘海金. 半滑舌鳎生长性状的微卫星标记筛选[J]. 海洋渔业,2012,34(2):121-129.
- [22] 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.
- [23] 孙效文,鲁翠云,曹顶臣,等. 镜鲤体重相关分子标记与优良子代的筛选和培育[J]. 水产学报,2009,33(2):177-181.
- [24] Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, *et al.* Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture,2006,254(1-4):203-210.
- [25] Fuji K,Hasegawa O,Honda K,*et al.* Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture,2007,272(1-4):291-295.

Analysis of genetic structure and growth traits in *Barbus capito* using microsatellite markers

LU Cuiyun, GENG Longwu, LI Chao, CHENG Lei, SUN Xiaowen, XU Wei*

(National Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: *Barbus capito* is an endemic species in the Aral Sea of Uzbekistan. It is well-known for its salt tolerance and fast growth, and is a valuable food source in the region. The species was introduced to China in 2003 and F_1 was obtained using artificial propagation in 2010. As an introduced species, *B. capito* has the relatively limited genetic resources due to the small founder population size. It is very important to effectively protect and utilize the existing gene resources in breeding practice. In this study, 24 microsatellite markers were selected to analyze the genetic structure in cultured F_1 population including 96 individuals. A total of 74 alleles were detected and the length of fragments ranged from 109 to 367 bp. The number of alleles per locus was from 2 to 5, and the mean was 3.0833. The effective number of alleles (N_e) ranged from 1.144 5 to 4.626 4 with an average of 2.265 6. The observed heterozygosity (H_o) and the expected heterozygosity (H_e) varied from 0.135 4 to 1.000 0 (mean = 0.538 4) and from 0.126 9 to 0.788 1 (mean = 0.487 2), respectively. The value of polymorphic information content (PIC) was between 0.118 3 and 0.749 0 with an average of 0.428 1, and this result indicated that the level of genetic diversity was moderate ($0.25 \leq PIC < 0.50$). The population accorded with Hardy-Weinberg equilibrium checking by χ^2 test except 8 markers including B1, B20, B32, B37, B45, B51, B68, and BC43. In addition, the correlation was analyzed between 24 microsatellite markers and growth traits using the GLM procedure of SPSS 19.0. As a result, there were 8 markers that had a significant ($P < 0.05$) impact on growth traits. Six markers including B1, B20, B45, B51, B59, and BC38 had a significant ($P < 0.05$) impact on body weight, length, height, and thickness. B26 had a significant ($P < 0.05$) impact on body weight, height, and thickness. BC3 had a significant ($P < 0.05$) impact on body weight and length. Superior genotypes were obtained using Duncan's multiple comparison.

Key words: *Barbus capito*; microsatellite; genetic structure; correlation

Corresponding author: XU Wei. E-mail: xwsc23@tom.com