

文章编号:1000-0615(2007)03-0273-07

镜鲤两个繁殖群体的遗传结构和几种性状的基因型分析

孙效文¹, 鲁翠云¹, 匡友谊¹, 金万昆², 沈俊宝¹,
朱晓东³, 李大宇⁴, 马海涛⁴, 于冬梅⁴

(1. 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开放实验室,
黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 国家级天津换新原良种场, 天津 301500;
3. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090; 4. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:利用扩增效果好、在群体中具有多态性的 28 个微卫星标记,检测国家换新良种场的镜鲤繁殖群体和黑龙江水产研究所松浦实验场的镜鲤繁殖群体的遗传组成,计算了两个群体的有效等位基因数,期望杂合度和多态信息含量等遗传参数,换新与松浦两个群体的有效等位基因数分别为 2.874 和 3.102,期望杂合度分别是 0.565 和 0.603,多态信息含量分别是 0.534 和 0.568;遗传结构分析研究结果表明这两个群体的多样性较高,信息含量丰富,具有进一步筛选出优良品种的遗传基础。但连锁不平衡分析表明这两个群体在较大的选择压力下,已严重偏离 Hardy-Weniberg 平衡,要保持群体的优良性状相关的遗传基础,应该在进一步的选种中注意增加群体的遗传多样性。也用 28 个基因座的不同基因型与换新 208 个亲本的体重值进行了连锁分析,得到 12 个与镜鲤体重相关的基因型,其中紧密相关的基因型 3 个;分析了一些严重偏离平衡的基因型,并分析了出现这种现象的可能原因,同时探讨了一些基因型与胚胎期致死或易感病基因连锁的可能性。为描述基因型偏离程度,创造了基因型偏离指数,并用其对群体中一些基因型出现的偏离现象进行了探讨。

关键词:镜鲤;繁殖群体;遗传结构;基因型

中图分类号:S 917 **文献标识码:**A

Analysis of the genetic structure of two mirror common carp population and genotypes for some traits

SUN Xiao-wen¹, LU Cui-yun¹, KUANG You-yi¹, JIN Wan-kun², SHEN Jun-bao¹,
ZHU Xiao-dong³, LI Da-yu⁴, MA Hai-tao⁴, YU Dong-mei⁴

(1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences and Key and Open Laboratory of Northern Fin Fish Bioengineering Breeding Certificated by the Ministry of Agriculture, Harbin 150070, China;
2. National Level Tianjin Huanxin Quality Fish Farm, Tianjin 301500, China;
3. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
4. Life Science and Technology Institute, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: The genetic composition of populations for a species is mainly collection of its different genotypes in all loci. In this paper, 26 microsatellite markers which had been identified with amplification reaction very well

收稿日期:2006-10-24

资助项目:国家重大基础研究计划资助项目(2004CB117405);农业部“引进国际先进农业科学技术”计划[2006-G55(A)]

作者简介:孙效文(1955-),男,吉林大安人,研究员,博士生导师,从事水产动物基因工程育种研究。E-mail:sunxw2002@163.com

and with polymorphism were used. Two breeding population of mirror carp that one is in National Level Tianjin Huanxin Quality Fish Farm an other one is in Songpu Fishery Station of Heilongjiang Fishery Institute were analyzed by those markers. Gene frequency (P), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphism information contents (PIC), and number of effective alleles (N_e) were determined. The linkage analysis was done between 26 loci and data from body weight of 208 individuals of Huanxin population, and 12 loci seems associated with body weight. Of those 12 loci, 3 are high significant linkage. Some significant deviate genotypes were also analyzed, and discuss the cause of this kind of deviation. It was discussed that whether those significant deviate genotypes linked with is a major determinant of fatal or near-fatal gene in early development of embryo of mirror carp, and that the possibility of those markers linked with genes sensitive to some diseases. For describe the content of those genotype deviation, an index named genotype deviate index was made. Few phenomenon of some genotypes deviation were studied using this new index.

Key words: mirror carp; breeding population; genetic structure; genotype

镜鲤是一个生产性能非常好的鲤品种^[1-2]。自上世纪 80 年代引入我国后,将其培育成一个适合我国北方养殖的优良品种^[3-4],并被国家原种和良种审定委员会认定为国家级良种。目前已成为池塘精养鲤最受欢迎的品种之一。但近年来养殖的镜鲤病害发生较多,尤其是网箱养殖过程中病害经常发生且很严重,养殖业者大多认为种质下降是病害经常发生的可能原因,不过确切的原因和机制还不清楚。近亲繁殖引起的遗传衰退仅仅是理论上的推测,还没有经过精确的遗传检测加以验证。

微卫星已广泛用于种质鉴定和群体遗传结构分析。全迎春等^[5]利用微卫星分析 4 个鲤养殖群体的遗传结构,认为这些群体的多态性较高,具有培育优良品种的遗传基础;Liao 等^[6]用 5 个微卫星标记分析两个鲤天然水域群体,发现基因座位上有遗传分化现象。但利用微卫星或其他分子标记分析镜鲤的繁殖群体并评估其遗传衰退现象的研究还未见报道。

利用鲤的多态性微卫星标记对两个镜鲤繁殖群体的遗传结构进行检测,并探索经高强度选择后的镜鲤群体与繁殖、生长、易感病害等性状相关的基因座位、基因型频率,为镜鲤繁殖群体的遗传结构优化、避免由近亲繁殖产生的生产性能下降和遗传衰退提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验鱼群体 从两个镜鲤繁殖群体得到实验样本。实验样本 1 取自天津换新国家级原种场

的镜鲤繁殖群体,这个群体是经过强度非常大的选择获得的,由 10 万尾左右的鱼种经过 1 龄、2 龄、3 龄 3 个年龄段的选择获得,强度在 100:2 左右。我们从这个群体中随机取样 208 尾,其中雌鱼 106 尾,雄鱼 102 尾。测量体长、体重等表型数据,并剪取鳍条提取 DNA。经初步 PCR 扩增分析证实所有样本 DNA 的质量均达到 PCR 扩增的质量,置于 4 ℃ 冰箱备用。实验样本 2 取自黑龙江水产研究所松浦实验场的镜鲤繁殖群体,这个群体是早期被审定的国家级原种的后代,选择强度较换新原种场低一些,约 30:1 的选择强度。共取亲鱼 131 尾的鳍条提取 DNA。其中雌鱼 76 尾,雄鱼 55 尾。没有测定表型数据。

微卫星标记 本研究使用了 28 个微卫星标记,这些标记是本课题组克隆鉴定多态性较高且等位基因间的差异较大的标记^[7]。

1.2 方法

高分子量基因组 DNA 的提取和纯化 剪取鱼鳍约 0.5 g,加入裂解液 0.5 mL(0.5% 十二烷基肌氨酸钠;200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白酶 K;0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA),50 ℃ 消化,等体积的酚/氯仿(酚/氯仿/异戊醇体积比为 25:24:1)抽提 2 次。用无 DNA 的 RNA 酶消化其中含有的 RNA,再用酚/氯仿抽提 2 次。经数次透析(透析液:50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris·Cl, pH 8.0; 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl),直到 $\text{OD}_{270} < 0.05$ 。加两倍体积的预冷的无水乙醇沉淀,离心除去上清液,等体积预冷的 70% 乙醇洗涤,离心除去上清液,室温干燥。用适量 1/10 TE 缓冲液溶解,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

PCR 反应程序 PCR 扩增反应总体积为 25 μL , 其中 PCR 反应缓冲液 18 μL (0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.3 的 Tris $\cdot\text{Cl}$, 1.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 0.0375 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 2.5×10^{-6} Gelatin, 2.5×10^{-5} Tween, 2.5×10^{-5} NP-40, dNTP 各 0.005 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); 基因组 DNA 约 50 ng, 微卫星引物 1 μL (上游、下游引物各 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Taq 聚合酶 1 U, 无菌超纯水补足总体积至 25 μL 。PCR 反应程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; PCR 循环程序为变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 54 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 总计 38 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

扩增产物检测 PCR 扩增反应产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 200 V 电泳 2 h, Gold View 染色, 溴酚蓝为上样液, SYNGENE 凝胶成像仪记录电泳结果, 1 Gel Works 软件包 (3.0 版本) 分析每个扩增条带的分子量与产物量的差异性。

统计指标 微卫星是共显性遗传, 可从琼脂糖电泳图上直接判断出个体的基因型, 计算出各个群体各个位点的等位基因频率 (allele frequency, P , 即 1 个群中某一基因占其等位基因的相对比率; 平均观测杂合度 (observing value of mean heterozygosity, H_o), 即实际观测到的杂合子在样本中所占比例的平均值; 平均期望杂合度 (expected value of mean heterozygosity, H_e); 有效等位基因数 (effective numbers of allele, N_e); 平均多态信息含量 (average polymorphism information content, PIC)。公式如下:

平均期望杂合度:

$$H_e = \sum_{i=1}^r h_i / r$$

某位点的有效等位基因数:

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

多态信息含量:

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

其中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 为群体中第 i 个位点的基因频率; h_i 为第 i 个位点的期望杂合度, r 为位点个数, H_e 为群体内平均期望杂合度; P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

基因座的连锁分析 基因座位间的连锁分

析利用两种方法。方法 1 是用 Fisher 氏模型作卡方检验, χ^2 是卡方值, P 是概率值显著性水平为 0.05 即 P 值大于 0.05 为不连锁, 小于 0.05 时为连锁; 方法 2 是用马尔科夫链模型计算两位点连锁不平衡分析, P 为概率值, S.E. 是标准误差, 当 S.E. 小于 0.05 时, 两位点是连锁的。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果与两个群体的遗传结构

PCR 扩增结果 所用标记是筛选出的多态性高且等位基因之间分辨清楚的标记, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可以清楚地分辨等位基因数 (图 1)。28 个标记在换新群体出现的等位基因数是 152 个, 平均 5.3 个; 在松浦群体中出现的等位基因数为 147 个, 平均 5.25 个。

群体的遗传结构 每个标记扩增出的电泳条带代表相对基因座的等位基因, 按 $P = (2 \times n_1 + n_2) / 2 \times N$ 公式计算每个等位基因的频率, 根据等位基因频率按材料与方法中所列公式计算出有效等位基因数 N_e , 平均期望杂合度 H_e , 平均多态信息含量 PIC (表 1)。

2.2 经济性状与基因型的相关分析

与体重相关的几个基因座位与基因型分析 将实验样本 1 的体重数据与所有基因型对比进行统计分析, 并将雌雄分开进行相关分析。得到如下结果: 换新群体的 106 尾雌鱼的平均体重是 5.29 kg, 102 尾雄鱼的平均体重是 4.75 kg。与体重明显相关的基因座位有 HLJ041 等 6 个 (表 2)。其中与体重最相关的基因型有 HLJ338 遗传座位的 363/232, HLJ041 座位的 368/256 和 HLJ343 座位的 171/171 等 3 个基因型。

与性状相关的几个特异基因型 两个镜鲤群体都是通过人工选择得到的繁殖群体, 选择指标是体重和体型, 富集的基因型应该与这两个性状相关。富集的基因型应该是偏离 Hardy-Weinberg 平衡的, 但一些基因型极端偏离平衡也是很有意思的现象。例如: 遗传座位 HLJ400 的基因型 358/319 按两个等位基因的频率在平衡状态下, 换新雌性群体应该有 7 个个体, 换新雄性群体应该有 2 个, 在松浦群体中应该有 6 个, 但所有群体中没有一个 358/319 基因型个体。HLJ338 遗传座位的 256/245 基因型个体按平衡状态计算, 应该在换新雌性群体中出现 16 个, 但只有 1

个;这个基因型在换新雄性群体中理论计算应出现 11 个,实际出现 7 个;这个遗传座位的其它基因型如与等位基因 263 相关的杂合子个体理论应

该出现 7 个,但实际上出现 9 个;这个基因型个体在松浦群体中理论计算为 9 个,实际出现 8 个。

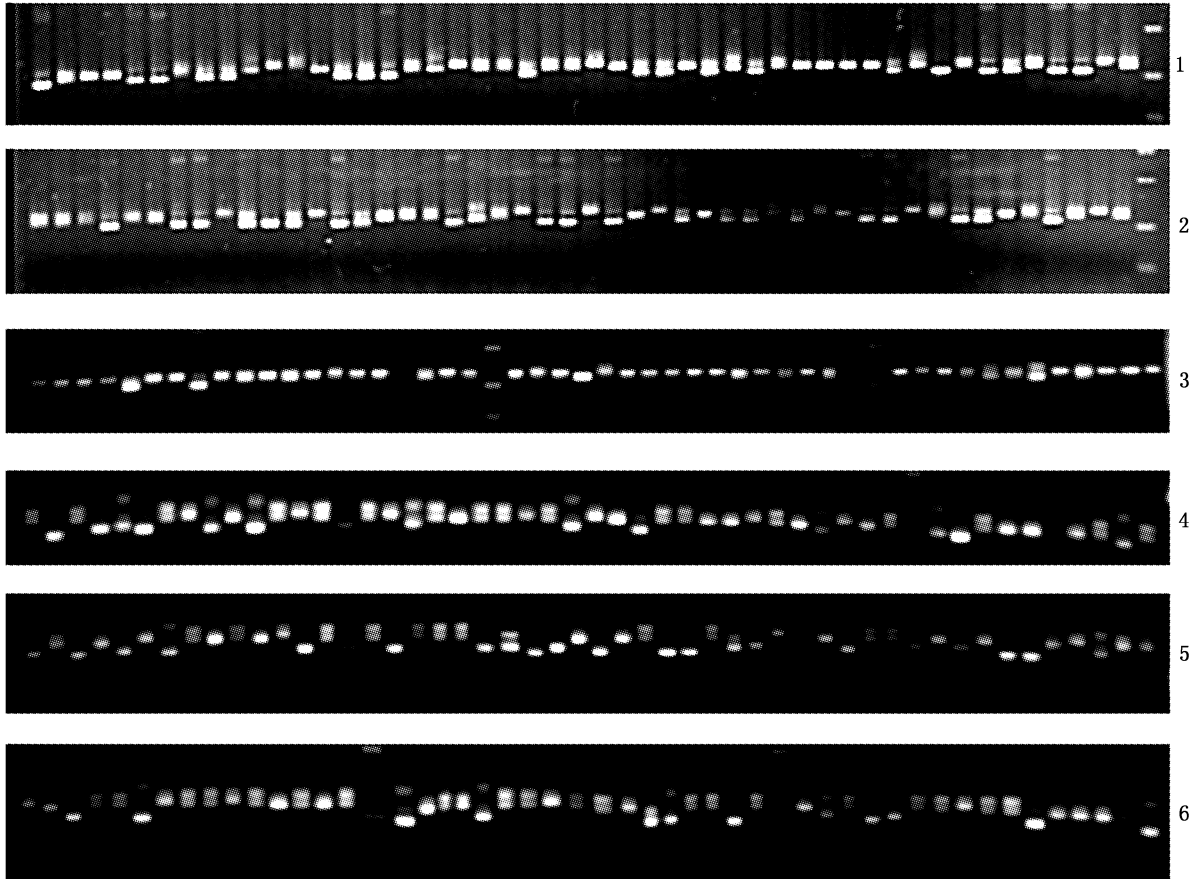


图 1 镜鲤群体 PCR 扩增的多态性

Fig.1 The genetic diversity in 2 loci for mirror carp

1-3 为位点 HLJ133,4-6 为位点 HLJ044 在换新群体的 PCR 产物电泳

1 to 3 were amplified from marker HLJ133, and 4 to 6 were amplified from marker HLJ044

表 1 两个群体的遗传结构参数

Tab.1 The parameters of genetic structure for two population

	有效等位基因数 N_e	有效等位基因数 N_e	平均多态信息含量 PIC
群体 1 population 1	2.874 (74.72)	0.565 (14.694)	0.534(13.876)
群体 1 population 2	3.102 (86.883)	0.603(16.887)	0.568(15.920)

注:群体 1 来自换新国家级原良种场,群体 2 来自黑龙江水产研究所松浦实验场

Notes: Population 1 is population from Huanxin Fishery Station; Population 2 is population from Songpu Station. It is the sum of 26 markers in parentheses

几个基因座的连锁分析 经 Fisher 氏模型作卡方检验和马尔科夫链模型计算两位点连锁不平衡分析得到 HLJ392 和 HLJ398, HLJ046 和 HLJ372, HLJ049 和 HLJ372, HLJ133 和 HLJ343,

HLJ060 和 HLJ315, HLJ055 和 HLJ307, HLJ046 和 HLJ049 等 7 对基因座紧密连锁,其中与体重相关的基因座位有 2 个,它们是 HLJ055 和 HLJ343。

表 2 换新群体几个遗传座位相关基因型与体重的相关性分析
 Tab.2 Relative analysis between genotype of some loci and body weigh

遗传座位 loci	基因型 genotype	性别 sex	平均体重(g) mean weight	体重百分比(%) percentage of mean weight
HLJ041	268/256	♀	6060	1.14
	268/256	♂	4870	1.02
HLJ055	64	♀	5790	1.03
	364	♂	4570	0.96
HLJ057	320/289	♀	5770	1.09
	320/289	♂	5140	1.21
HLJ302	244	♀	5540	1.05
	244	♂	4470	0.98
HLJ338	Het.	♀	5610	1.06
	Hom.	♀	5160	0.97
	Het.	♂	5270	1.11
	Hom.	♂	4570	0.96
	263/232	♀	7270	1.37
	263/232	♂	3450	0.72
HLJ343	171	♀	6070	1.15
	171	♂	4960	1.04

注:Het.表示是杂合子, Hom.表示纯合子

Notes: Het. means heterozygote, and Hom. means homozygote

3 讨论

3.1 人工选择对群体基因型的影响

两个群体间的遗传结构差异 两个镜鲤繁殖群体的统计分析结果显示松浦群体的有效等位基因数、期望平均杂合度和群体平均多态信息含量都高于换新群体。我们推测主要原因有两个,一是换新群体筛选强度要高于松浦群体,这在材料与方法中已介绍,另一个原因是松浦镜鲤是较早培育的群体,还带有起始品种的一些杂合基因型来源,而换新群是在松浦群体之上进一步选择得到的,因此一些与选择压力相关的基因型在换新群会更集中、更富集,即相关基因型频率和相关基因频率会升高,而其它一些稀有等位基因在更大的选择压力下丢失。

体重相关的基因型 本实验筛选到几个与体重相关的基因型,其中多数与雌鱼体重紧密相关而与雄鱼体重相关不紧密,如 HLJ041 的 268/256 等。在雌鱼群体中检测到较多(比较雄鱼)的与体重相关标记的原因可能有两个,一是这类基因位点可能与雌性染色体连锁,因此这类基因型仅在雌鱼中表现出与体重相关;第二个原因可能与选择方式有关,雌鱼多以体重为主进行选择,雄鱼由于早成熟一年选择多以体形为主,因此,在雌

性群体中富集了更多的与体重连锁的基因型,而在雄鱼由于选择压力相对较低没有富集到与雌鱼相同多的与体重相关的基因型。

HLJ338 座位中的 263/232 基因型与体重的关系比较有意思,在雌性群体中与体重相关最紧密,是所有群体中平均体重最大的基因型;但是这个基因型在雄鱼中却是最小的,这个基因型在雌雄不同个体中的这种表现如果得到确证,那对基因标记选择体重性状的技术路线的建立是非常不利的,也就是说这个对雌性体重有益的基因型如果富集较多,虽然对雌鱼生长有利但对同群体中的雄鱼体重获得是不利的。363/232 在雌雄两类群中与体重的相悖现象可能与鲤雌性表现生长快而雄鱼相对生长慢的普遍现象的遗传控制机制相关,因此,很有必要利用这个基因型的遗传规律来做一些深入探索。

上述分析的与体重相关的几个基因型仅仅是换一个新的群体的检测结果,使用的标记也仅有 28 个,是否是体重相关的主要基因型,还有待对其它群体做同样的检测,对换新群体也需要增加更多的标记来进一步验证。

3.2 几个基因型的偏离

偏离指数的引入 HLJ338 座位的 256/245 基因型个体在雌鱼群中出现的数量远比通过基因

频率所做的理论计算结果要少得多,根据公式计算这个基因型个体应该有 16 个,但实际仅有 1 个。我们创造一个基因型偏离指数来描述这种偏离程度:偏离指数 f ,理论推测值 N ,实际出现值 n ,则: $f = (n^2 - N^2)/(n \times N)$ (f 值为正则实际个体数大于理论计算个体, f 值为负数,则实际个体数少于理论计算个体数,绝对值越大偏离越远)在换新雌性群体中 256/245 基因型的 f 值为: $f = 1 - 256/16 = -15.3$,表明这个基因型严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡。在换新雄性群体中 256/245 基因型的 f 值为: $f = -0.93$,松浦镜鲤 256/245 基因型的 f 值为: $f = -1.77$,虽然也是偏离理论计算值,但偏离不是很远。这个结果显示 256/245 基因型在群体中出现比例主要还是与选择强度和选择方式决定的。因为雌性以选择体重为主要方式,而这个基因座位上是有与体重紧密相关的基因型 263/232,所以 256/245 这个与体重不相关的基因型受到体重选择压力的作用,在换新雌性群体中选择丢失较多,使偏离指数负值过大,而在对体重选择压力较小的雄鱼群体中和选择强度较低的松浦镜鲤群体中,由于选择压力较低,这个基因型的偏离指数负值较小。通过基因型频率可以计算群体在这个基因座位上偏离 Hardy-Weinberg 平衡的程度,这在群体遗传结构分析中比较常用^[8]。本文创造的基因型偏离指数较为简单,表观数值大,生物学意义清楚(表示基因型偏离平衡的程度),可以简化计算偏离 Hardy-Weinberg 平衡的复杂计算过程。同一物种天然群体间或不同品种间在遗传本质上的差别主要来自于基因型的差别,这里表述的基因型偏离指数能否达到突出群体间差别,便于种内不同群体的区分和鉴定有待进一步检验。

极端偏离的基因型 遗传座位 HLJ400 的基因型为 358/319 的个体为零,按两等位基因频率计算 358/319 基因型个体理论上应该有 15 个个体,即 $n = 2 \times (\sum P_i \times P_j \times N_n) = 15$ 。本研究检测的三个群体中没有一个 358/319 基因型个体出现,这种基因型完全丢失的极端情况是不符合基因型分布规律的,该基因型的偏离指数 $f = -\infty$,说明该基因型极端偏离平衡状态。HLJ400 座位上共有 10 种基因型,与体重的连锁分析表明没有一个基因型是与体重相关的,因此,体重选择的压力对 358/319 基因型出现的多少无关。可能 358/319

基因型属疾病易感型,有这种基因型的个体在亲本养殖过程中由于疾病而死亡或在选择时被淘汰,也可能这种基因型是极端致死基因型,所有的个体都在胚胎期死亡。这个推断是否正确需要进一步的研究来证明。还应指出的是上述对几个基因偏离尤其是极端偏离的分析是从遗传平衡理论出发所做的推测,更准确的结果有待与德国镜鲤原种(这两个群体的直接亲本已不存在)作对比分析才能得到。

对于同物种的不同选育品种来说,不同基因型的富集或丢失可以作为区分和鉴定这些不同品种的标记。而镜鲤 HLJ400 座位的 358/319 基因型和 HLJ338 座位的 256/245 基因型可以作为区分和鉴别镜鲤两个繁殖群体的标记,这样的标记也可以用于鲤其它品种的鉴别。

3.3 基因型检测与鲤育种

共显性标记在育种研究中的作用 好的遗传标记是鱼类高效育种的基础。在传统育种中鳞被、体色都是育种研究经常利用的遗传标记^[9-10]。在数量众多且多呈中性的 DNA 分子标记出现后,遗传与育种学家的共识是 DNA 分子标记是大幅度提高育种效率的强有力工具^[11-13],各国政府也将分子育种视为转基因技术之外可以获得优良品种的重要技术^[14-15]。微卫星标记检测方便且多为共显性标记,应该是育种中非常有用的遗传标记,在 70 年前,Fisher 就认为共显性标记是检测性状的优良标记^[16]。本研究在利用微卫星检测 2 个镜鲤的群体遗传结构的分析中也体会到共显性标记的优越性,尤其是观察、计算杂合子和显性基因型出现的频率方面可以获得显性标记无法得到的结果。

所获几个性状相关基因型的利用价值 分子标记在鱼类育种中潜在的应用方向之一是利用基因型与经济性状的连锁关系,并将这个基因型作为选择这个性状优势品种的工具。本研究获得的与体重相关的分子标记及其基因型,经在其它群体进一步证实后,可作为体重选择标记用于镜鲤新品系的培育;一些标记尤其是极端偏离平衡的标记可能与易感病遗传组成有关,很可能作为筛选抗病品系的标记,因为易感病与抗病总是相关的。另外表型选择如果选择强度大,实际上也是一个综合性状选择,长期保持优良性状的镜鲤品系为我们提供了大量控制综合性状优良的基