

文章编号:1000-0615(2007)05-0575-08

3个德国镜鲤养殖群体遗传变异的微卫星分析

胡雪松, 李池陶, 马波, 石连玉

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:利用10个多态微卫星标记对我国北方不同地区3个德国镜鲤(*Cyprinus carpio L.* mirror)群体(绥化,BL;哈尔滨,BZ;天津,TJ)的遗传多样性及群体间的亲缘关系进行研究。结果显示,3个养殖群体在10个位点上表现出较高的多态性,其中9个位点表现为高度多态($PIC > 0.5$);平均杂合度为0.629 3;10个位点共检测出144个等位基因;BL与TJ群体的总体变异水平高于BZ群体。Nei氏 D_A 遗传距离分析显示,BL与TJ群体的遗传距离最近,而与BZ群体的遗传距离最远;群体间遗传分化微弱($F_{st} = 0.0315$),群体内变异占总变异的96.85%,3个群体各自特有的等位基因频率普遍较低(0.0125~0.1500),群体共有的等位基因频率相对较高。上述结果表明,3个德国镜鲤养殖群体仍保持着较高的遗传多样性,群体间未产生明显的遗传分化。

关键词:德国镜鲤;微卫星;遗传变异

中图分类号:S 917

文献标识码:A

The microsatellite analysis of genetic variability for 3 domesticated populations of German mirror carp

HU Xue-song, LI Chi-tao, MA Bo, SHI Lian-yu

(Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Nowadays, the selective German mirror carp (*Cyprinus carpio L. mirror*) is one of the excellent breeds adapted to pond conditions in the North area of China. In China, however, the information on their genetic variability is unavailable. Here, to evaluate the genetic diversities and relationships among 3 populations (BL, BZ and TJ) located at Suihua, Harbin and Tianjin of China respectively, 10 polymorphism microsatellite markers were used. The results demonstrated that 3 populations showed high polymorphism in 9 loci ($PIC > 0.5$), and the average heterozygosity degree per locus was 0.629 3. Meantime, 144 alleles were detected in all examined loci. Among them, BL and TJ populations had higher genetic variation than BZ population. The analyses of Nei's D_A genetic distance indicated the closest relationship was between BL and TJ, and the largest distance was observed between BL and BZ. Only little genetic differentiation was detected among the 3 populations ($F_{st} = 0.0315$), and the internal variation was 96.85% of the total variation. Furthermore, the own alleles frequencies of each population were commonly lower (0.0125~0.1500), but the shared alleles frequencies of total populations were relatively higher. Therefore, it is concluded that the selective populations of German mirror carp in different regions of China

收稿日期:2006-12-15

资助项目:国家科技攻关计划项目(2004BA526B0104);黑龙江省科技计划项目(GB04B506)

作者简介:胡雪松(1977-),男,黑龙江依兰人,硕士,从事鱼类遗传育种研究。E-mail: hxsgh@163.com

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

still kept high genetic diversity, and the genetic differentiation among populations was not significant.

Key words: German mirror carp; microsatellite; genetic variability

德国镜鲤(*Cyprinus carpio L. mirror*)原产于德国巴伐利亚,是欧洲流行的池塘养殖品种,该鱼具有含肉率高、鳞被少等特性。自20世纪80年代引入我国以来,经过4代选育,在生长、抗寒、抗病等性状上有很大提高^[1],为养殖户与消费者接受和喜爱,并成为适应我国北方池塘养殖的理想品种,被农业部列为优良新品种^[2]。随着德国镜鲤养殖规模及分布地域的逐步扩大,在基因水平上研究其后裔群体遗传变异及群体间的遗传关系对防止群体退化,保持群体高效、稳定生产十分必要。

微卫星标记以孟德尔方式共显性遗传,是目前遗传学研究领域中应用最广泛的分子标记之一。微卫星最突出的优点是具有高水平的变异,且其多态信息易于通过PCR技术获得^[3],与同工酶或其它标记相比,微卫星更适合于亲缘关系较近的生物群体间的遗传关系研究^[4]。国内外学者曾利用微卫星标记对多个养殖鲤群体的遗传变异进行过卓有成效的研究^[5~9],但对于德国镜鲤的研究尚未见相关报道。本文采用微卫星技术对我国北方不同地区3个养殖规模相对较大的德国

镜鲤选育群体的遗传多样性及群体间亲缘关系进行研究,以考察在隔离养殖期间群体内及群体间的遗传变异规律,为初步了解这一优良品系的遗传背景,并在此基础上进行科学引种和选育提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 样本采集及基因组DNA提取

本研究所用的106份德国镜鲤的鳍条样本分别采自黑龙江省绥化清涛渔场(BL)(36尾)、黑龙江水产研究所松浦实验站(BZ)(40尾)及天津市换新良种渔场(TJ)(30尾)。采用常规酚/氯仿法提取鳍条中基因组DNA,纯化并定量至50 ng·μL⁻¹。

1.2 微卫星的PCR扩增和基因型判定

研究采用的10对多态性微卫星引物中,有9对根据Crooijmans等^[10]报道的鲤微卫星引物(MFW++)合成,核心序列为(CA)_n;另外1对引物参考Yue等^[11]的文献,核心序列为(TG)_n,引物序列见表1。

表1 10对微卫星引物序列、退火温度及等位基因大小

Tab. 1 Sequences, annealing temperature of 10 microsatellite primers and size of alleles

位点 locus	引物序列 primer sequences(5'→3')	退火温度(℃) annealing temp.	等位基因大小(bp) allelic size
MFW1	GTCCAGACTGTCATCAGGAG	63.7	166~216
MFW5	GAGATGCCTGGGAAGTCAC	62.9	226~256
MFW7	TACTTGCCTCAGGACGGATGC	61.5	188~276
MFW11	GCATTGCTTGTGATGGTTG	58.7	162~214
MFW14	CAGAACGCTCTGGAAATCTGAG	60.1	98~162
MFW16	GTCCATTGTCAGAGATAGAG	60.1	112~192
MFW24	GCTCCAGATTGCACATTATAG	60.1	213~237
MFW29	GTTGACCAAGAACCAACATGC	61.6	142~214
MFW30	GGTCAACAAAGTAGTTGCGAG	58.7	240~248
CCA16	AATGTTTCGCTAATTGACACC	56.3	238~266

PCR反应体系总体积25 μL,其组成为10×PCR buffer 2.5 μL,10 mmol·L⁻¹ 4×dNTPs 2 μL,2.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 1.5 μL,10 pmol·μL⁻¹上下游引物各1 μL,*Taq* DNA聚合酶1 U,50 ng·μL⁻¹ DNA模板1 μL。反应条件为94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,以适宜的温度(表

1)退火30 s,72 ℃延伸30 s,循环25次,72 ℃继续延伸5 min,4 ℃保存。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,利用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色。电泳图谱利用Gel-pro analyzer 4.5软件分析,结合PCR产物长度及双核苷酸重复确认片段大小并判定基因型。

1.3 数据处理

用 Popgene32 软件计算平均杂合度(average heterozygosity, H)及群体间遗传分化指数(F_{st})；利用 FSTAT293 软件分析各位点及群体的基因丰度(alleles richness, A_r)；多态信息含量(polymorphism information content, PIC)参照 Botstein 等^[12]提供的方法计算。利用 Dispan 软件包计算 Nei 氏 D_A 遗传距离^[13]，并根据 D_A 遗传距离用 Mega 3.1 软件构建 3 个群体的 UPGMA 聚类图，群体间的基因流通过公式 $N_m = (1 -$

$F_{st})/4F_{st}$ 计算。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点的电泳检测结果

本研究选用的 10 对微卫星引物在检测群体中均能扩增出稳定的 PCR 产物，利用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶对 PCR 产物进行分离，位点 MFW5 和 MFW7 在各群体部分样本中的检测结果见图 1，所有位点检测结果的原始图谱见图版 I 和图版 II。

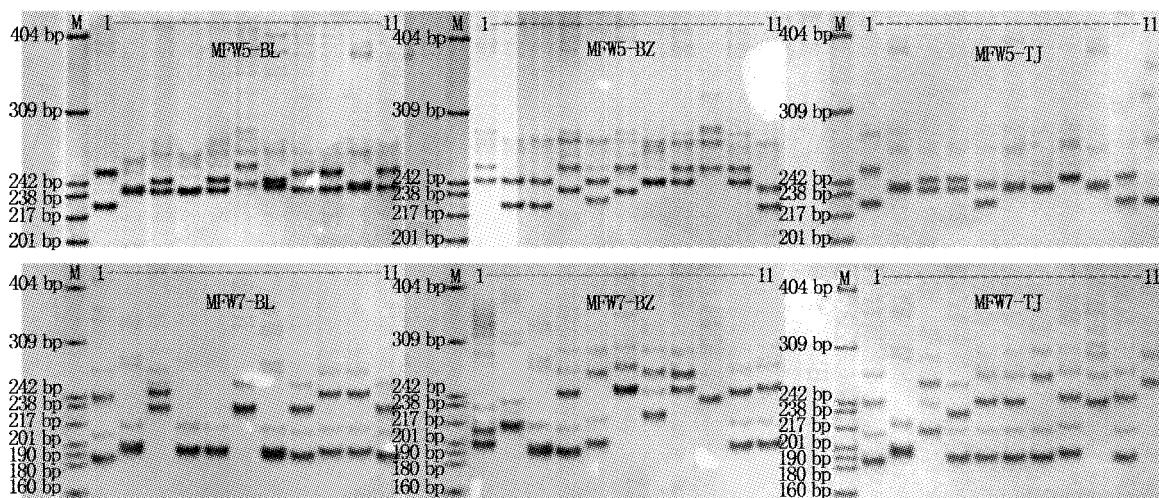


图 1 3 个德国镜鲤群体(绥化, BL; 哈尔滨, BZ; 天津, TJ)在微卫星位点 MFW5 和 MFW7 的 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 The 10% polyacrylamide gel results at MFW5 and MFW7 loci of 3 German mirror carp populations (Suihua, BL; Harbin, BZ; Tianjin, TJ) 1 ~ 11: 样本序号; M: pBR322/MspI Marker

2.2 群体遗传多样性分析

德国镜鲤群体的遗传变异参数如表 2 ~ 表 4。从表 2 可知，对于整个群体而言，德国镜鲤表现出较高的遗传多样性，每个微卫星位点的平均杂合度(H)为 0.629 3；9 个位点表现为高度多态($PIC > 0.5$)，表明这 9 个位点的等位基因分布较均匀，且能提供丰富的多态信息，适合于德国镜鲤的遗传多样性研究；3 个群体的遗传变异范围较大，在 10 个位点上共检测出 144 个等位基因，平均每个位点的等位基因数(N_a)从 3 个(MFW30)到 25 个(MFW7)不等；9 个位点的等位基因丰度(A_r)超过 6 个，平均 A_r 为 10.8。由表 3 可知，TJ 群体

的 H 最高(0.655 3)，BZ 群体最低(0.592 3)；BL 群体具有最高的 PIC (0.794 0)，BZ 群体同样最低(0.747 8)。从各群体的等位基因分布来看，BL 群体的 N_a 最高(10.8)，BZ 和 TJ 群体的 N_a 相当，分别为 10.1 和 10.0；但各群体的 A_r 与 N_a 并不完全一致，TJ 群体的 A_r (9.8)高于 BZ 群体(9.1)。由表 4 可见，有 44 个等位基因为各群体所特有，BL、BZ 及 TJ 群体各自特有的等位基因数分别为 17、14 和 13 个，鉴于这些等位基因的频率普遍较低(0.012 5 ~ 0.150 0)，仅有 4 个基因的频率达到 0.1，所以不能将这些基因作为区分 3 个群体的特异性分子标记。

表2 10个微卫星位点的遗传变异参数
Tab. 2 Parameters of genetic variation for 10 microsatellite loci

位点 locus	等位基因数 N_a	等位基因丰度 A_r	多态信息含量 PIC	平均杂合度 H	遗传分化指数 F_{st}
MFW1	17	12.9	0.880	0.8381	0.0354
MFW5	7	6.6	0.784	0.7642	0.0270
MFW7	25	17.3	0.902	0.7429	0.0262
MFW11	19	13.7	0.876	0.6381	0.0305
MFW14	12	9.6	0.821	0.5189	0.0376
MFW16	21	14.8	0.877	0.5755	0.0259
MFW24	13	10.3	0.844	0.4434	0.0259
MFW29	16	11.6	0.842	0.7830	0.0349
MFW30	3	2.3	0.382	0.3762	0.0402
CCA16	11	9.3	0.819	0.6132	0.0357
平均数 mean	14.4	10.8	0.802	0.6293	0.0315

表3 3个德国镜鲤群体的遗传变异参数
Tab. 3 Parameters of genetic variation for 3 German mirror carp populations

群体 population	等位基因数 N_a	基因丰度 A_r	多态信息含量 PIC	平均杂合度 H
BL	10.8	10.3	0.7940	0.6483
BZ	10.1	9.1	0.7478	0.5923
TJ	10.0	9.8	0.7813	0.6553

表4 3个德国镜鲤群体各位点特有的等位基因大小及频率
Tab. 4 Size and frequencies of private alleles for 3 German mirror carp populations

位点/等位基因 locus/allele	群体 population	等位基因频率 allele frequency	位点/等位基因 locus/allele	群体 population	等位基因频率 allele frequency	位点/等位基因 locus/allele	群体 population	等位基因频率 allele frequency
MFW1			MFW11			MFW24		
186	BL	0.0139	174	BL	0.0278	225	BL	0.0556
210	BL	0.0972	172	BZ	0.0128	213	BZ	0.0125
198	BZ	0.1500	196	BZ	0.0256	223	BZ	0.0125
182	TJ	0.0172	180	TJ	0.0167	219	TJ	0.1000
192	TJ	0.0172	182	TJ	0.0500	221	TJ	0.0500
196	TJ	0.0172	214	TJ	0.0166	MFW29		
MFW7			MFW14			158	BL	0.0139
202	BL	0.0694	106	BZ	0.0125	164	BL	0.0694
212	BL	0.0278	108	BZ	0.0125	178	BL	0.0278
226	BL	0.0139	MFW16			206	BZ	0.0125
240	BL	0.0417	112	BL	0.0139	210	BZ	0.0750
250	BL	0.0139	140	BL	0.0694	MFW30		
236	BZ	0.0625	156	BL	0.0278	270	BL	0.0143
238	BZ	0.1375	182	BL	0.0139	CCA16		
242	BZ	0.0125	156	BZ	0.0278	250	TJ	0.1000
214	TJ	0.0517	192	BZ	0.0250			
234	TJ	0.0172	122	TJ	0.0500			
264	TJ	0.0172						

2.3 群体间遗传变异及亲缘关系

各位点上群体间遗传分化指数(F_{st})为0.0259~0.0402,3个群体在10个位点的平均 F_{st} 为0.0315(表2),表明只有3.15%的变异是由群体分化导致的,而96.85%的变异来源于群

体内。由表5可知,群体间成对的 F_{st} 值的范围介于0.0184(BL与TJ)和0.0292(BL与BZ)之间,这与Nei氏 D_A 遗传距离显示的结果一致,BL与TJ群体的亲缘关系最近(0.1522),同BZ群体最远(0.1829)。群体间每代迁移数(N_m)均较

高(大于8),以BL与TJ间最高(13.35)。基于 D_A 遗传距离构建的3个群体的UPGMA聚类结果见图2。由图2可见,遗传距离最近的BL与TJ群体先聚在一起,二者再同BZ群体聚为一类。

表5 3个德国镜鲤群体间成对的 F_{st} 值、每代迁移数(N_m)值(上三角)及Nei氏 D_A 遗传距离(下三角)

Tab.5 Pairwise F_{st} values, migrants per generation (N_m) values (upper triangle), and Nei's D_A genetic distance (lower triangle) between each pair of 3 German mirror carp populations

群体 population	BL	BZ	TJ
BL		0.0292(8.32)	0.0184(13.35)
BZ	0.1829		0.0240(10.18)
TJ	0.1522	0.1721	

注:括号内是 N_m 值, $N_m = (1 - F_{st}) / 4F_{st}$
Notes: Number in bracket is N_m value. $N_m = (1 - F_{st}) / 4F_{st}$

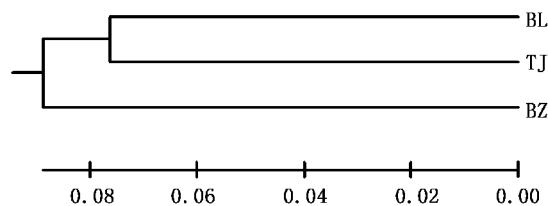


图2 3个德国镜鲤群体的UPGMA聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram for 3 German mirror carp populations based on D_A genetic distance

3 讨论

3.1 群体内遗传变异

杂合度也被称为基因遗传多样性指数,无论对于野生还是养殖群体,保持适当的杂合度都具有重要意义。杂合子个体自交,基因经过重组和分离,可能产生更适应环境,生产性能更高的基因型个体,提供潜在的新的育种资源;杂合子个体自身通常具有更高的生长、繁殖及抗病力^[14]。本研究中3个德国镜鲤群体的平均杂合度结果(0.5923~0.6553)同印尼的9个养殖鲤群体相似(0.500~0.709)^[6],高于匈牙利的3个养殖鲤群体(0.557~0.614)^[7],说明虽然这些群体已引进二十余年,仍保持着较高的遗传多样性。这可能与各群体均缺乏系统选育、群体间有较多的基因交流有关,较高的 N_m 值(大于8)支持这一观点。

等位基因多样性用某个位点的实际等位基因

数来衡量,该指标比平均杂合度更为敏感,更易受到外部环境因素的影响,如选择、漂变、遗传瓶颈等^[15],因此更适合评价群体近期的遗传变异水平。本研究采用等位基因丰度来评估等位基因数,它不受样本量的影响^[16],可以满足此次不同群体样本量存在差异的需要。本实验在3个德国镜鲤群体中检测到每个位点的平均等位基因丰度为9.1~10.3,明显高于兴国红鲤(Xingguo red carp)(7.3)、青田鲤(Qingtian carp)(6.0)、荷包红鲤(Purse red carp)(4.7)^[8];法国品系(French strains)(6.2)、捷克品系(Czech strains)(4.2)^[9]等多个养殖鲤群体。这表明我国的德国镜鲤群体近交程度较弱,群体内尚有较高程度的遗传变异。

许多研究表明^[17~19],鱼类养殖群体比野生群体更易受到遗传漂变、瓶颈效应、高度选育或近交等因素的影响而逐渐丧失遗传多样性。本研究中的德国镜鲤群体具有较高的遗传多样性和变异水平,具有较大的选育空间和良好的养殖前景。

3.2 群体间遗传关系

群体间的遗传关系可由所有微卫星位点上的所有等位基因的接近程度来衡量,遗传距离可准确体现这种程度的大小。 D_A (Nei, 1983)遗传距离具有更小的取样误差,据此能精确地获得聚类分析图^[4]。

从群体遗传关系的分析结果看,尽管由于选育及地理隔离使群体间产生了一定的遗传距离,但成对的 F_{st} 值显示,群体间的遗传分化微弱,3个群体的亲缘关系较近。2个群体间每代的迁移数(N_m)均大于8,如此高的基因流足以防止由遗传漂变引起的群体间的遗传分化,检测到的10个位点平均仅有3.15%的变异是由群体间分化导致的,而总变异的96.85%发生于群体内也说明了这一点。对群体等位基因频率的分析结果也验证了这一点,即群体间共有的等位基因占据了较高频率,而3个群体各自特有的大多数等位基因都属低频($P < 0.05$)等位基因(表4)。

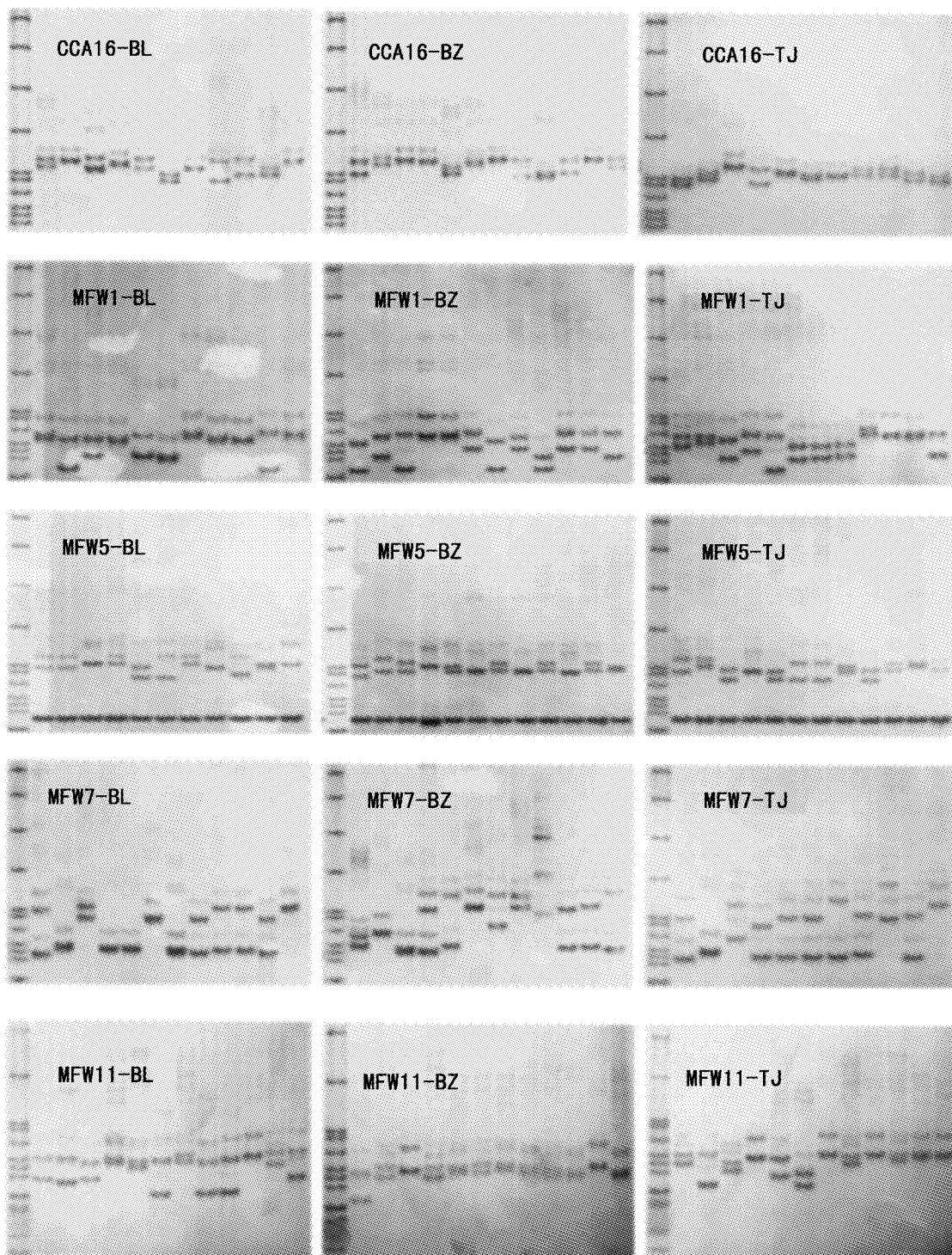
聚类分析结果为BL同TJ群体先聚为一类,二者再同BZ群体聚为一类,这与3个群体的选育方式相符。BL与TJ群体同属大型商业渔场,主要以经济性状(如生长力、鳞被等)作为选育目标。相比而言,BZ群体以保种为目的,一直以其最初亲代(F_4)的遗传特性为选育标准。另外,BL与TJ的亲鱼群体有效数量较大,需及时更新和补

充,彼此发生基因交流的可能较大;而BZ亲鱼群体有效数量较小,更新和补充缓慢,与外界发生基因交流的机会相对较少,这与群体间 N_m 的分析结果相一致,因此基因交流也可能是BL与TJ群体遗传距离更近的原因。

综合本研究结果可见,目前德国镜鲤选育群体仍保持着较高的遗传多样性,具有较大的选育潜力;3个群体间的亲缘关系较近,遗传分化微弱,表明3个地区的德国镜鲤群体在相对隔离养殖的二十几年中,群体间未产生明显的遗传变异。生产中从任一群体引种都不会带来遗传多样性的下降,但注意到群体间已产生一定的遗传距离,所以还应根据实际养殖需要灵活选择。

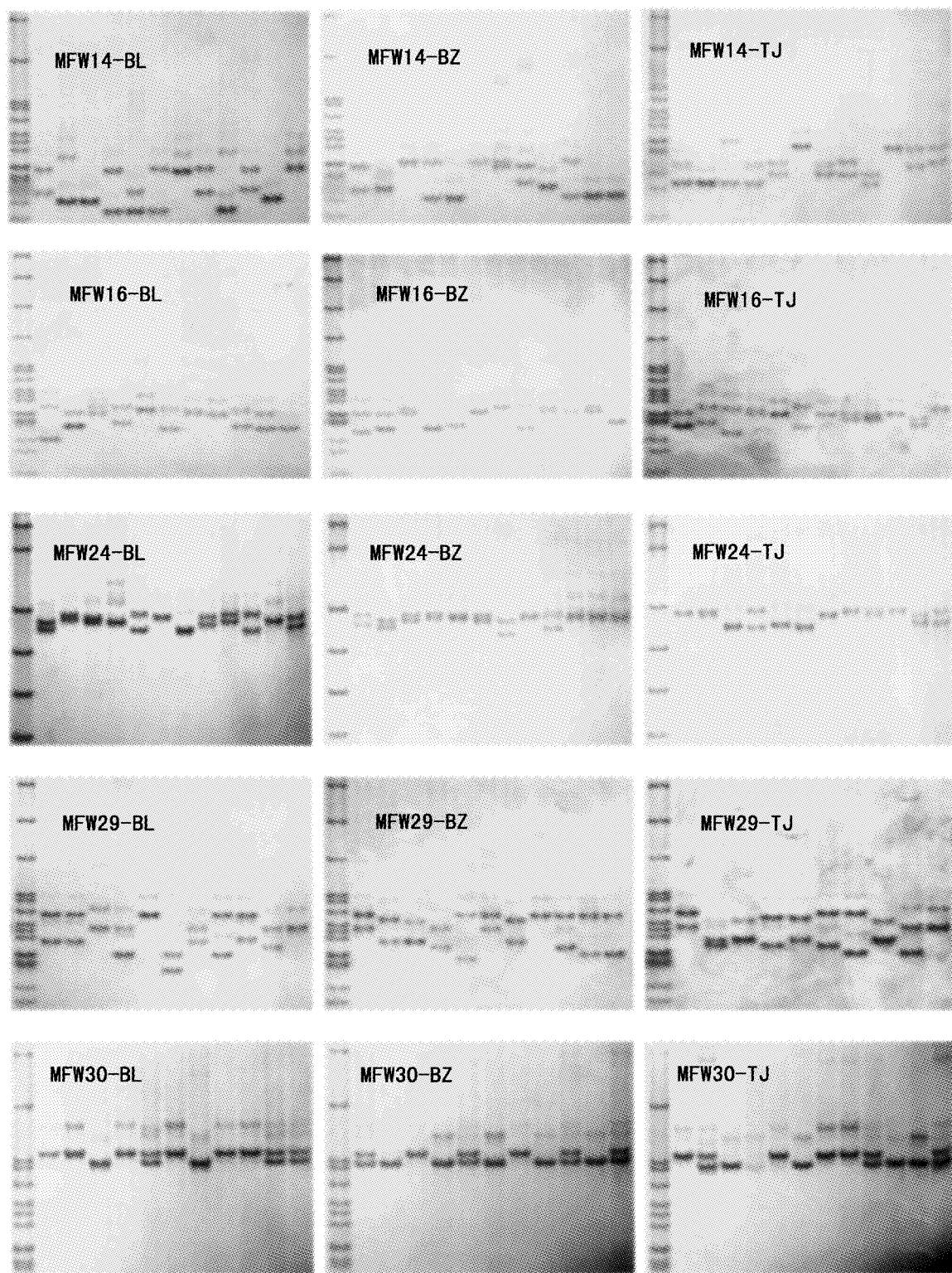
参考文献:

- [1] 刘明华,白庆利,沈俊宝.德国镜鲤选育及生产应用研究[J].黑龙江水产,1995,3:4~10.
- [2] 叶奕佐.农业部已公布的淡水鱼优良品种[J].水产科技情报,2002,29(3):139.
- [3] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7: 331~363.
- [4] Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA[J]. Genetics, 1996, 144:389~399.
- [5] 全迎春,孙效文,梁利群.应用微卫星多态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] Aliah R S, Taniguchi N. Comparison of genetic variability in nine domesticated stocks of Indonesian common carp using microsatellite DNA markers [J]. Fish Genetics and Breeding Science, 1999, 28: 121~130.
- [7] István L, István M, Csaba H, et al. Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers[J]. Hydrobiologia, 2005, 533:223~228.
- [8] Zhou J, Wu Q, Wang Z, et al. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers[J]. Russian Journal of Genetics, 2004, 40 (10):1144~1148.
- [9] Desvignes J F, Laroche J, Durand J D, et al. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites[J]. Aquaculture, 2001, 194: 29~301.
- [10] 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.
- [11] Yue G H, Ho M Y, Orban L, et al. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp[J]. Aquaculture, 2004, 234:85~98.
- [12] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Animal Genetics, 1980, 32:314~331.
- [13] Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data[J]. Journal of Molecular Evolution, 1983, 19:153~170.
- [14] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture [J]. Aquaculture Research, 1997, 28:829~839.
- [15] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. Evolution, 1975, 29:1~10.
- [16] El Mousadik A, Petit R J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92:832~839.
- [17] 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.
- [18] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations [J]. Aquaculture, 1999, 180:247~264.
- [19] Li Q, Park C, Endo T, et al. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Aquaculture, 2004, 235:207~222.



图版 I 10 对微卫星引物在 3 个德国镜鲤养殖群体(绥化,BL;哈尔滨,BZ;
天津,TJ)部分样本中的 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Plate I The original maps of 10 % polyacrylamide gel using 10 microsatellite
primers in partial samples of 3 German mirror carp
populations (Suihua BL, Harbin BZ, Tianjin TJ)



图版 II 10 对微卫星引物在 3 个德国镜鲤养殖群体(绥化,BL;哈尔滨,BZ;天津,TJ)
部分样本中的 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Plate II The original maps of 10 % polyacrylamide gel using 10 microsatellite
primers in partial samples of 3 German mirror carp
populations (Suihua BL, Harbin BZ, Tianjin TJ)