

文章编号:1000-0615(2009)06-0893-08

团头鲂“浦江1号”选育后期世代群体同野生群体间遗传变异的 ISSR 分析

赵岩, 李思发, 唐首杰

(上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

摘要:以团头鲂“浦江1号”选育后期3个世代群体(F_7 、 F_8 、 F_9)为试验对象、其选育奠基群体(1985年淤泥湖野生群体)后代、淤泥湖野生群体(2007年)、梁子湖野生群体(2007年)为对照材料,通过ISSR标记技术分析,并通过部分样本的细胞色素**b**基因测序的补充验证,了解选育所产生的遗传变异及野生群体遗传结构现状。主要结果:(1)从100个ISSR引物中筛选出26个引物,扩增出清晰、可重复的条带共164条,多态性条带比例49.39%。细胞色素**b**基因在选育良种3个世代中只发现一种单倍型。(2)选育群体同选育奠基群体后代、野生群体间的遗传差异显著,如群体多态位点百分数, F_9 (28.05%)比选育奠基群体后代(40.24%)减少了30.29%,比淤泥湖野生群体(41.46%)减少了32.34%。选育群体同淤泥湖野生群体间的遗传相似系数最小(0.9350),距离最大(0.0672),两两配对 F_{ST} 值最大($F_{ST}=0.30572$);UPGMA法构建系统进化树表明,选育群体同野生群体处于两个大分支,而在野生群体大支中,选育奠基群体后代与淤泥湖原种野生群体间配对 F_{ST} 值最小($F_{ST}=0.05045$)。(3)选育群体 F_7 、 F_8 、 F_9 各世代间遗传分化虽弱(低 G_{ST} 0.1417值,高 N_m 3.0279值),但多态位点百分数、位点基因平均多样性、Nei氏基因多样性、群体内Shannon多样性指数等遗传参数仍然都呈现随选育世代数的累进而降低的趋势。(4)ISSR比细胞色素**b**基因更适合近缘种的相关关系研究。(5)经过二十多年9代的选育,相对于野生群体,团头鲂“浦江1号”良种已产生了明显的遗传分化,性状已相当稳定,但离选育极限尚有一定距离,今后应在继续监测其遗传结构变化的基础上,进一步挖掘选育潜力,同时要避免种质混杂、近交衰退及瓶颈效应等的发生。

关键词:团头鲂;“浦江1号”选育良种;野生群体;ISSR;细胞色素**b**

中图分类号:Q346;S917

文献标识码:A

团头鲂原产于长江中游的梁子湖、淤泥湖等大、中型湖中,自1955年被定种以来,逐渐成为我国主要养殖对象之一^[1]。团头鲂“浦江1号”是以从湖北省淤泥湖(2000 hm²)引进的团头鲂原种亲鱼为基础群体,选育产生的优良品种^[2],至2007年已选育至第9代。ISSR(inter-simple sequence repeats)分子标记是用SSR引物来扩增重复序列之间的区域,为显性标记,遍布细胞核基因,较RAPD重复度高更可信,较AFLP成本低易于操作,许多研究表明,该分子标记适于研究鱼类

尤其是近缘群体的遗传多样性^[3-6]。线粒体DNA细胞色素**b**基因(cyt *b*)属细胞核外遗传物质,具有母系遗传特点,被广泛应用于鱼类类群识别、系统关系、起源分化与扩散等领域的研究^[7]。

采用分子标记分析水产经济动物由于人工选育造成群体遗传差异的研究,我国已在“新吉富罗非鱼”^[8-10]和中国对虾“黄海1号”^[11-13]两个品种有所报道。然而,在分子水平上对团头鲂选育良种和野生群体的遗传结构的差异尚未见报道,尤其是对选育后期世代间的遗传分化尚未及

研究。本研究借助这一分子手段对团头鲂选育群体,野生群体间的遗传变异进行检测,了解选育群体遗传结构变化和野生群体的遗传结构现状,以期制订相应的科学措施来保证育种和保种工作的持续开展,同时也可以增进对选育干涉对鱼类群体遗传结构和进化影响的了解,丰富相关的理论基础和参数。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从上海海洋大学(原上海水产大学)南汇鱼类种质实验站取团头鲂“浦江1号”选育良种(选育系)F₇、F₈和F₉共3个世代的样本各30尾,选育奠基群体(1985淤泥湖原种)后代的样本30尾,2007年12月年分别从湖北省公安县淤泥湖和湖北省鄂州梁子湖国家级团头鲂原种场取的野生群体各30尾。共6个群体。每尾标本剪取尾鳍,分别编号后于95%乙醇中保存备用。

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 提取参照常规的酚-氯仿抽提程序进行,并通过紫外分光光度计检测,稀释到同一浓度。

基因组 DNA 的 ISSR 扩增和线粒体 DNA 细胞色素 b 基因测序 ISSR 引物是 University of British Columbia 设计的成套引物,由上海生工生物工程公司合成,反应混合液总体积为 25 μL,内含约 40 ng 基因 DNA,3 μL Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 3.0 mmol/L MgCl₂, 0.001% 明胶), 0.2 mmol/L 每种 dNTP, 引物浓度 0.25 μmol/L, 1.2 U *Taq* 酶。在 Eppendorf Master cycler Gradient PCR 仪上摸索每个引物的最适退火温度。PCR 反应循环程序为 94 °C 预变性 5 min,接着 94 °C 30 s,引物各自的退火温度如表 1 所示,30 s,72 °C 60 s,40 个循环后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。取 10 μL PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶(含适量 EB)电泳,电泳缓冲液为 0.5 × TBE,电压为 5 V/cm。电泳结束后用 Gene genius 型凝胶成像系统拍照、记录、分析。上述 ISSR 扩增反应均至少重复两次,只有清晰且重复度高的条带被用来数据处理与分析。细胞色素 b 基因扩增测序参照颉晓勇^[8]的方法,引物序列 Cyt b-F: accataatggcaagcctacg, Cyt b-R: cctccgatcttcgattaca,退火温度 55 °C。

数据处理与分析 ISSR-PCR 数据, DNA 带的有无用 1 或 0 表示,利用 POPGENE 1.31 软件^[14]计算。

(1) Nei 氏(1973)基因多样性^[15],相当于期望杂合度,即从样本中随机取两个个体为不同单倍型的概率:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

式中, n 表示基因样本中基因数, k 表示单倍型的数目, P_i 表示单倍型 i 的频率。

(2) 群体内 Shannon 多样性指数^[16]:

$$H_o = - \sum (X_i \ln X_i) / N$$

式中, X_i 为位点 i 在某一群体中出现的频率, N 为所测座位数。

(3) Nei 氏(1978)校正偏差后群体间遗传相似性系数 I 和群体间遗传距离 D ^[17]:

$$I = (2n-1) \sum (X_i Y_i) / \{ \sum [2n(X_i)^2 - 1] \sum [2n(Y_i)^2 - 1] \}^{1/2}$$

式中, X_i 、 Y_i 分别为 X 和 Y 群体第 i 个位点的等位基因频率。

群体间 Nei 遗传距离: $D = -\ln I$ 。

(4) 遗传分化指数^[18] (G_{ST} , coefficient of population differentiation):

$$G_{ST} = 1 - H_s / H_T$$

式中, H_T 为群体总基因多样性(total gene diversity), H_s 为群体内基因多样性(gene diversity within populations)。

基因流^[14,18] (N_m , gene flow):

$$N_m = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$$

利用 ARLEQUIN 3.11 软件^[19]计算。

(5) 位点基因平均多样性^[20]:

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

式中, \hat{d}_{ij} 表示由于单倍型 i 和 j 分离出现突变数目的估计, k 表示单倍型的数目, p_i 表示单倍型 i 的频率, L 表示位点数。

计算群体间配对比较的遗传分化指数值 F_{ST} ^[21],用排列测试法(permutation test)检测 F_{ST} 的显著性(重复次数为 1000),最后进行分子方差分析(AMOVA)。

细胞色素 b 基因数据,用 Bioedit 软件^[22]对测序结果进行编辑,以 CLUSTL W 软件^[23]进行

序列重排和同源性比较,并辅以人工核对校正。

2 结果

2.1 ISSR-PCR 数据

SSR-PCR 扩增结果 本实验所用引物共计 100 个,选其中能够稳定重复扩增条带的引物 26 个,这 26 个引物的序列及编号见表 1。

这 26 条引物在 6 个群体中共扩增出 164 个条带,平均每个引物扩增 6.31 条带。扩增片段大小为 300 ~ 2 300 bp。其中多态位点共 81 个,占 49.39% (表 1)。

基于 ISSR-PCR 数据的团头鲂 6 群体的遗传多样性 考虑到养殖群体可能对当地野生群体的影响,本研究在重新对湖北省淤泥湖野生群体采样分析的同时,还引入梁子湖野生群体加以参照,实验数据表明这两个野生群体均保持了较高

的遗传多样性。就多态位点百分数,位点基因平均多样性,Nei 氏基因多样性,群体内 Shannon 多样性指数这几个指标而言,选育群体均显著低于野生和选育奠基群体后代(t 检验, $P < 0.05$),选育群体间呈现出随选育世代累进而降低的趋势(表 2)。

基于 ISSR-PCR 数据 6 群体间的遗传相似系数及遗传距离 6 群体间的遗传相似系数为 0.947 6 ~ 0.983 8,遗传距离为 0.016 3 ~ 0.067 2,其中 F_0 与野生群体的遗传相似系数最小,遗传距离最远; F_9 与 F_8 世代间的遗传相似系数最大,遗传距离最小(表 3)。系统进化树见图 1。配对比较 F_{ST} 值见表 4。

基于 ISSR-PCR 数据选育后期世代的遗传分化 选育后期世代间表现为低 G_{ST} 0.141 7 值,高 N_m 3.027 9 值(表 2)。

表 1 实验用 26 条 ISSR 引物序列及编号

Tab.1 Sequences and numbers of 26 ISSR primers used in this study

引物序号 primer code	5' ~ 3' 序列 sequence 5'-3'	退火温度(°C) annealing temperature	扩增条数 total number of loci	多态性条数 number of polymorphic loci
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	47	5	0
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	51	7	5
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	44	6	3
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	50	7	0
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50	5	0
813	CTCTCTCTCTCTCTCT	47	5	2
814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	49	8	7
815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	49	8	4
820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	58	6	4
823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	55	5	3
824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	55	7	5
828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	55	6	4
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	50	7	0
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	54	5	0
848	CACACACACACACACARG	60	8	6
853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	45	6	0
854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	46	5	5
861	ACCACCACCACCACCACC	57	8	5
866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	56	5	3
868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	40	6	4
872	GATAGATAGATAGATA	43	4	4
873	GACAGACAGACAGACA	46	6	4
876	GATAGATAGACAGACA	47	6	5
890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	44	8	2
899	CATGGTGTGGTCAATGTCCA	57	7	6
900	ACTTCCCACAGGTTAACACA	50	8	0

表2 团头鲂6群体的遗传多样性

Tab.2 Genetic diversity in six populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

群体 population	多态位点 百分数 percentage of polymorphic loci	位点基因平均 多样性 average gene diversity over loci	Nei 氏基因 多样性 Nei's gene diversity	Shannon 多样性指数 Shannon genetic diversity	遗传分化 指数 G_{ST}	基因流 N_m
梁子湖 Liangzi Lake	39.63	0.124 825 ± 0.063 122	0.142 6 ± 0.192 0	0.212 7 ± 0.278 8	-	-
淤泥湖 Yuni Lake	41.46	0.128 161 ± 0.064 752	0.149 3 ± 0.196 6	0.222 1 ± 0.283 0	-	-
奠基群体后代 base group	40.24	0.124 460 ± 0.062 944	0.146 1 ± 0.196 9	0.216 7 ± 0.283 5	-	-
F ₇	31.10	0.109 265 ± 0.055 521	0.107 3 ± 0.177 5	0.160 6 ± 0.257 8		
F ₈	29.27	0.094 029 ± 0.048 076	0.104 1 ± 0.172 9	0.156 4 ± 0.253 5	0.141 7	3.027 9
F ₉	28.05	0.085 674 ± 0.043 993	0.101 3 ± 0.174 7	0.151 1 ± 0.254 3		

表3 基于 Hardy-Weinberg 平衡假设的团头鲂6群体间 Nei 氏遗传相似系数及遗传距离

Tab.3 Nei's unbiased measures of genetic identity and genetic distance among six populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

	梁子湖 Liangzi Lake	淤泥湖 Yuni Lake	奠基群体后代 base group	F ₇	F ₈	F ₉
梁子湖 Liangzi Lake		0.976 0	0.958 6	0.958 9	0.950 2	0.947 6
淤泥湖 Yuni Lake	0.024 3		0.983 8	0.954 6	0.936 5	0.935 0
奠基群体后代 base group	0.042 3	0.016 4		0.958 1	0.951 3	0.948 3
F ₇	0.041 9	0.046 5	0.042 8		0.971 5	0.964 0
F ₈	0.051 1	0.065 6	0.049 9	0.029 0		0.983 8
F ₉	0.053 8	0.067 2	0.053 1	0.036 7	0.016 3	

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为遗传相似系数

Notes: The figures below the diagonal represent genetic distances, above the diagonal represent genetic identities

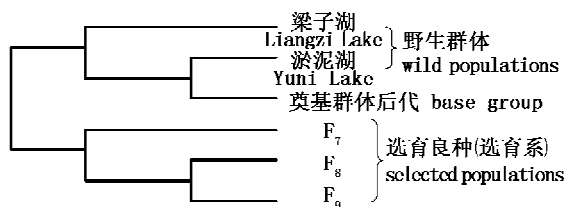


图1 根据群体间遗传距离,采用 UPGMA 法构建的团头鲂6群体的系统进化树

Fig.1 UPGMA dendrogram based Nei's genetic distance of six populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

分子方差分析(AMOVA)发现:团头鲂“浦江一号”选育 F₇、F₈、F₉ 3 个世代的遗传变异有 85.01% 来自选育世代内部,而有 14.99% 来自于世代间(表 5)。这表明,选育后期世代的遗传变异主要来源于各选育世代内个体间的遗传差别。

2.2 细胞色素 b 基因序列分析结果

对六群体共 90 个样本线粒体 DNA 细胞色素 b 基因 PCR 扩增,扩增片段大小约为 1 000 bp

左右。各扩增片段(不包括引物及部分端部序列)经同源重排后的长度(不包括插入/缺失)为 760 bp,其中 F₇、F₈、F₉ 的单倍型相同(表 6)。

3 讨论

3.1 ISSR-PCR 与细胞色素 b 基因序列

大量 ISSR 扩增片段的检出,说明团头鲂核 DNA 中含有丰富的微卫星序列,此外,核 DNA 中停止密码(stop codon)附近不翻译区是富含 AT 碱基的,变异压力可能会影响到停止密码的有无和分布^[24],而有些 ISSR 引物往往自身富含 AT 碱基,故也会产生 ISSR 扩增多态性。本研究团头鲂选育群体内的多态位点比例(28.05% ~ 31.10%)同 Liu 等^[5]用同样方法研究牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)人工选育群体的结果(27.45% ~ 28.15%)相类似。本研究所检测到的个体间细胞色素 b 基因的变异位点极少,可能系由于其编码蛋白质受到的选择压力大、与线粒体其他区域相比进化速度属中等^[7]、统计数据时

只选取了可信度较高的部分序列所致。但相比而言,ISSR 比细胞色素 *b* 基因更适合近源群体的相

关关系分析。

表 4 团头鲂“浦江1号”选育后期世代群体同 团头鲂野生群体间配对比较的 F_{ST} 值及相应 P 值
 Tab.4 Pairwise comparison of F_{ST} values and their corresponding P value between the late generations of “Pujiang No.1” and wild populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

	梁子湖 Liangzi Lake	淤泥湖 Yuni Lake	奠基群体后代 base group	F_7	F_8	F_9
梁子湖 Liangzi Lake	0.000 00	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0
淤泥湖 Yuni Lake	0.099 27	0.000 00	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0
奠基群体后代 base group	0.155 24	0.050 45	0.000 00	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0
F_7	0.121 80	0.193 72	0.187 21	0.000 00	0.000 00 ± 0.000 0	0.000 00 ± 0.000 0
F_8	0.183 12	0.258 16	0.190 86	0.144 63	0.000 00	0.000 00 ± 0.000 0
F_9	0.211 51	0.305 72	0.243 66	0.199 95	0.094 86	0.000 00

注:对角线以下为配对比较的 F_{ST} 值,对角线以上为相应 P 值
 Notes: The figures below the diagonal represent F_{ST} values, above the diagonal represent P value

表 5 团头鲂“浦江1号”3 世代的 AMOVA 分析
 Tab.5 AMOVA analysis of three late selected generations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

变异来源 source of generation	自由度 degree of freedom	方差总和 sum of squares	变异组分 estimated variance of components	所占比例(%) percent of variation
世代间 among generations	2	99.378	1.39301 Va	14.99
世代内 within generation	87	687.167	7.89847 Vb	85.01
总和 total	89	786.544	9.29148	

表 6 团头鲂 6 群体 *cyt b* 基因单倍型多样性
 Tab.6 Haplotype diversity (H) of *cyt b* gene in six populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

	梁子湖 Liangzi Lake	淤泥湖 Yuni Lake	奠基群体后代 base group	F_7	F_8	F_9
样本数 sample size	16	10	16	16	16	16
单倍型数 number of haplotype	3	3	3	1	1	1

3.2 选育良种同野生群间的遗传分化

选择会使不同的座位间产生不同的杂合度 (heterozygosity), 直接导致座位间同质性检测 homogeneity test(χ^2) 的显著差异^[17], 本研究中有如位点 823 -5, 其 $\chi^2 = 14.806 126$, 显著性检验 $P < 0.005$, 其余略。而用引物 848 在两个野生群体和对照系中扩增出的片段, 在选育良种(F_7 、 F_8 、 F_9) 三个世代群体内都未检测到(图 2), 该位点可能和生长等表型性状存在负相关性^[25-26]。

在进化过程中, 选择使等位基因的变异可以区分, 从而产生遗传上的分化^[25]。基于 ISSR 结果, 选育奠基群体后代多态位点百分数 40.24%,

与淤泥湖原种野生群体(41.46%) 接近, 两群体间配对 F_{ST} 值最小($F_{ST} = 0.050 45$), 且同处于一个进化分支(图 1)。不同于此, 选育良种(F_7 、 F_8 、 F_9) 同野生群体处于两个大的分支(图 1), F_9 比淤泥湖原种野生群体遗传多样性显著降低, 其中多态位点百分数减少了 32.34%, F_9 与淤泥湖原种野生群体间的遗传相似系数最小, 遗传距离最远, 两两配对 F_{ST} 值最大。在自然条件下, 长期的地理隔离会造成不同群体间产生遗传分化。Wright^[27] 认为, 当 F_{ST} 大于 0.25 时表示遗传分化极大。本研究中 F_9 与淤泥湖原种野生群体间的 F_{ST} 值为 0.305 72, 表明团头鲂“浦江1号”选育良

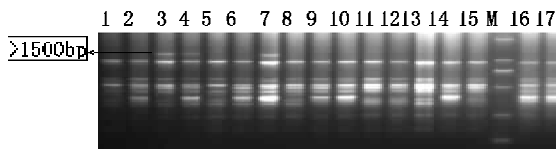


图2 引物 848 在团头鲂 6 群体扩增结果

M 代表 marker 200 ~ 2 000 bp; 梁子湖: 1-3; 淤泥湖: 4-6; 奠基群体后代: 7-9; 选育 F_7 : 10-12; 选育 F_8 : 13-15; 选育 F_9 : 16-18

Fig. 2 The amplified results of primer S848 in six populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

M represents marker 200 - 2 000 bp; Liangzi Lake wild: 1-3; Yuni Lake wild: 4-6; base group: 7-9; selected F_7 : 10-12; selected F_8 : 13-15; selected F_9 : 16-18

种的遗传基础在 20 年左右的时间内产生了与长期地理隔离效应相当的群体遗传分化。与此同时,“浦江 1 号”良种在表型性状方面也表现了明显的生长优势,这些足以证明通过人工选育,该良种在基因型和表型两方面已有别于野生种群,得到了遗传改良。

3.3 选育后期世代间的遗传分化

假设当有利基因全部固定时选择反应停止,群体处于选择极限或选择峰台。而有关选择极限这一问题的研究较为复杂,就选择极限的存在尚有许多不同的观点。涉及到不同的选择对象,准确的极限点以及达到极限所需的准确的代数难以确定,而处于极限状态时群体也可因突变和迁移等产生新的遗传变异^[28]。Appukuttan 等^[25]用 ISSR 和 RAPD 相结合的方法对蚕 (*Bombyx mori*) 的选育群体的四个世代的研究发现,尽管幼虫期经过选育得以延长,但在分子水平上,选育群体间产生了巨大的遗传分化,表现为高 G_{ST} 0.527 伴随着低 N_m 0.449,同时其 Nei 氏基因多样性为 F_1 (0.12), F_2 (0.11) 递减, F_3 突然激增到最大 (0.20), F_4 回落 (0.125)。产生如此显著性波动的原因可能是,原本通过选择被降低了频率的基因由于某些原因重新扩散到群体,再次选择后又迅速被降低频率乃至淘汰,预示了其达到选育高原 (selection plateau) 之后,由于等位基因的纯合化,会使后续选育无效这一可能性^[29-30]。本研究采用 ISSR 方法对团头鲂“浦江 1 号”选育后期世代群体间的分子遗传差异予以比较和预测。发现团头鲂选育良种 F_7 、 F_8 及 F_9 均保持了良好的生长优势,细胞色素 *b* 基因在选育系 3 个世代中只

发现一种单倍型;同时 ISSR 分析结果表明,这 3 个世代间的遗传分化虽弱(低 G_{ST} 0.141 7 值,高 N_m 3.027 9 值),但多态位点百分数、位点基因平均多样性、Nei 氏基因多样性、群体内 Shannon 多样性指数等遗传参数均呈现随选育世代数的累进而降低的趋势;故推测团头鲂“浦江 1 号”已经历了一个可能的显著波动期,同生长、体型等相关的主基因已被固定。如果对其进一步选择若干世代,其遗传多样性(异质性)仍可能表现出降低趋势甚至波动,但其中遗传漂变的作用将逐渐大于选择压力的作用,直至达到选育极限。

研究在闭锁群体内做连续世代的长期选择的结果,不仅有利于了解动植物育种的长期选择效应,而且有益于理解进化机制^[28]。经过二十多年 9 代的选育,团头鲂“浦江 1 号”良种相对野生群体产生了明显的遗传分化,性状已相当稳定,但离选育极限尚有一定距离,今后应在监测其遗传结构变化的基础上,进一步挖掘选育潜力,同时要注意避免种质混杂、近交衰退及瓶颈效应等的发生^[31-33]。

感谢湖北省鄂州梁子湖国家级团头鲂原种场协助采集部分样本。

参考文献:

- [1] 李思发. 中国淡水主要养殖鱼类的种质研究[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996.
- [2] 李思发. 鱼类良种介绍团头鲂浦江 1 号[J]. 中国水产,2001,11:52-52.
- [3] 谢潮添,纪德华,陈昌生,等. ISSR 标记在坛紫菜不同色泽丝状体种质鉴定中的应用[J]. 水产学报,2007,31(1):105-111.
- [4] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with interimple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 408-417.
- [5] Liu Y G, Chen S L, Li J, et al. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers [J]. Aquaculture, 2006, 255: 565-572.
- [6] Hou L, Lü H L, Zou X Y. Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers [J]. Aquaculture, 2006, 261: 865-871.
- [7] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化

- [J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-391.
- [8] 颜晓勇. 新吉富罗非鱼选育过程中遗传变异跟踪研究[D]. 上海:上海水产大学博士学位论文,2008.
- [9] 颜晓勇,李思发,蔡完其. 吉富品系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.
- [10] 张传涛,李思发,颜晓勇. 吉富品系尼罗罗非鱼选育系 $F_6 - F_9$ 遗传变异的 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报,2007,16(1):7-10.
- [11] 张天时,刘 萍,李 健,等. 用微卫星 DNA 技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究[J]. 水产学报,2005,29(1):6-12.
- [12] 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):71-80.
- [13] 何玉英,刘 萍,李 健,等. 中国明对虾快速生长选育群体的 RAPD 分析[J]. 海洋水产研究,2005,26(4):8-13.
- [14] Yeh J C, Yang R, Boyle T. POPGENE, version 1.31, microsoft window-based freeware for population genetic analysis,1999.
- [15] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973,70:3321-3323.
- [16] King L M, Schaal B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* [J]. Evolution,1989,42:1117-1119.
- [17] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89:583-590.
- [18] Slatkin M, Barton N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow[J]. Evolution, 1989, 43:1349-1368.
- [19] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN Version 2.000: a software for population genetics data analysis [M]. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- [20] Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York :Columbia University Press, 1987.
- [21] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies [J]. Genetics, 1995, 139: 457-462.
- [22] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1998, 41:95-98.
- [23] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucl Acids Res, 1994, 22: 4673-4680.
- [24] Xia X, Xie Z, Li W H. Effects of GC content and mutational pressure on lengths of exons and coding sequences[J]. Mol Evol, 2003, 56: 362-370.
- [25] Appukuttan R P, Shankar N, Chatterjee, et al. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems [J]. Appl Genet, 2005, 46(3):291-298.
- [26] Chani E, Ashkenazi V, Hillel J, et al. Microsatellite marker analysis of an anther-derived potato family: skewed segregation and gene-centromere mapping [J]. Genome, 2002, 45: 236-242.
- [27] Wright S. Evolution and the genetics of population [M]. Chicago: The Univ of Chicago Press, 1978.
- [28] 盛志廉,陈瑞生. 数量遗传学[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [29] B ünger L, Herrendorfer G. Analysis of a long-term selection experiment with an exponential model [J]. Anim Breed Genet, 1994, 111: 1-13.
- [30] Strunnikov V A. Control over reproduction, sex and heterosis of the silkworm [M]. Luxembourg: Harwood Academic Publishers, 1995.
- [31] 李思发,杨怀宇,邹曙明. 快速近交对团头鲂遗传结构的影响和近交效应的估算[J]. 水产学报,2005,29(2):161-165.
- [32] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [33] 李思发,蔡完其. 团头鲂双向选育效应研究[J]. 水产学报,2000,24(3):201-205.

Genetic variations among late selected strains and wild populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) by ISSR analysis

ZHAO Yan, LI Si-fa, TANG Shou-jie

(The Key Laboratory of Aquatic Genetic Resource and Aquacultural Ecosystem Certificated
by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis was performed in order to evaluate three successively selected populations ($F_7/F_8/F_9$ of Pujiang No. 1 breeding improved variety), two wild populations (Liangzi Lake/Yuni Lake of 2007) and one hatchery population (Base group, offspring of Yuni lake of 1985) of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). The sequence analysis of mitochondrial DNA cytochrome gene was also used to evaluate the effectiveness of ISSR analysis. Main results: (1) Among 100 ISSR primers, 26 could produce 164 clear and repeatable bands, of which 81 bands appeared to be polymorphic (49.39%). The sequencing analysis of the *cyt b* gene presents that three selected generations (F_7, F_8, F_9) of Pujiang No. 1 possess the same haplotype. (2) There is a high genetic differentiation between wild/base and selected populations. Compared to Yuni Lake and base population, the percentage of polymorphic loci of F_9 generation decreased by 32.34% and 30.29% respectively. Genetic distance (0.0672), pairwise F values (0.30572) were the highest between F_9 generation and Yuni lake population. Based on the UPGMA dendrogram; the selected populations (F_7, F_8, F_9) are genetically distinct they were placed in a relatively derived position as the sister branch to a branch containing wild and base populations, it also shows the closest relationship between Yuni Lake and base population. (3) The low G_{ST} value (0.1417) combined with the high N_m value (3.0279) contributed to lower degree of genetic divergence among selected populations (F_7, F_8, F_9); The percentage of polymorphic loci/Average gene diversity over loci/Nei's (1973) gene diversity and Shannon genetic diversity show a tendency that it has been decreased generation by generation. (4) The ISSR technique used was confirmed to be more sensitive than *cyt b* sequence analysis for the study of closely related populations. (5) The authors acknowledged that, through over 20 years and 9 generations selection, compared with the wild population, Pujiang No. 1 variety exhibits a significant differentiation from the wild population in genetics, and shows a rather high stability in improved trails, but there is still some distance from the plateau of selection. In the future, based on the monitoring of changes in genetic structure, potential for selection should be tapped further and attention should be paid to the possible mix in genetics, inbreeding and genetic bottleneck.

Key words: blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*); Pujiang No. 1 genetic improved variety; wild population; ISSR; *cyt b*