

两个镜鲤半同胞家系的遗传多样性及经济性状分析

王洪哲^{1,2} 张 研^{1,4} 殷倩茜^{1,3} 曹顶臣¹ 孙效文¹ 梁利群¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070 2. 铁岭市水产技术推广站, 铁岭 112000

3. 大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023 4. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 在两个镜鲤半同胞家系中, 各随机选取 47 尾作为实验鱼, 测量体重、体长、全长等数量性状, 利用 24 个微卫星分子标记对其进行遗传检测, 共检测到 57 个等位基因, 每个基因座的等位基因数为 1—6 个不等, 平均等位基因 3.21 个, 片段长度在 134—371 bp 之间, 有效等位基因数 N_e 为 1.00—2.89, 平均观察杂合度 H_o 为 0.00—0.83, 平均期望杂合度 H_e 为 0.00—0.66, 平均多态信息含量 PI_C 为 0.00—0.58。结果表明: 2 个家系的遗传多样性处于中度水平, 但连锁不平衡分析表明这两个家系在较大的选择压力下, 已严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡。利用 SPSS 程序下的 GLM 过程对 24 个微卫星位点与主要经济性状的相关性进行分析, 结果发现: *HLJ519*、*HLJ848*、*HLJ855*、*HLJ84* 4 个微卫星位点对镜鲤体重显著影响 ($p < 0.05$), 其中, 位点 *HLJ519*、*HLJ848*、*HLJ855* 还对体长和全长存在显著影响 ($p < 0.05$)。对这些位点基因型所对应的表型均值进行了多重比较, 找到了一些对主要经济性状有利的基因型。

关键词: 微卫星标记; 镜鲤; 遗传多样性; 经济性状; 相关分析

中图分类号: Q346+.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)03-0522-10

微卫星 DNA 在真核和原核基因组中蕴藏丰富, 散布于整个基因组中, 是一类短串联重复序列 (Short tandem repeats STRs), 其核心序列一般由 2—6 个碱基构成, 平均每 15—20 kb 就出现一个^[1], 具有分布广泛, 信息量大, 高度多态及遵循孟德尔共显性遗传等优点^[2], 被广泛应用于遗传连锁图谱构建、QTL 定位、亲子鉴定、群体遗传结构分析等方面^[3-6]。由于微卫星集中了其他分子标记的优点, 被认为是研究群体遗传结构最好的方法之一^[7]。

鲤科鱼类在我国境内分布最广, 是我国淡水鱼类中种类最多的一个科^[8,9]。中国鲤鱼有多个种群如镜鲤 (*Cyprinus carpio*)、荷包红鲤 (*C. carpio*)、兴国红鲤 (*C. carpio singuonensis*)、黄河鲤 (*C. carpio haematoperus*)、松浦鲤 (*C. carpio*) 等, 其中镜鲤是养殖范围最广的鲤科鱼之一。镜鲤生长速度快, 肉质好, 是一个生产性能非常好的鲤鱼品种^[10,11]。自 20 世纪 80 年代引入我国, 经过黑龙江水产研究所 20 多年的系统选育, 现已培育出抗寒、抗病, 适于我国

大部分地区养殖的镜鲤选育系并展开规模化养殖。但随着养殖面的不断扩大, 养殖镜鲤的发病率在不断增加, 性成熟个体主要经济性状衰退的现象也不断出现。利用微卫星在鲤鱼群体遗传上的研究报道很多^[8,12-17], 但未见有关利用微卫星分子标记对镜鲤家系间遗传变异及与主要经济性状相关性分析的研究报道。据此, 本研究利用 24 对微卫星标记对两个半同胞镜鲤家系的遗传多样性及主要经济性状相关性进行分析和研究, 比较两个家系间的遗传变异, 找出各基因座位对镜鲤经济性状的影响, 同时在一些座位上找到了对镜鲤主要经济性状有利的基因型, 并发现了与主要经济性状相关的等位基因; 为镜鲤的进一步选育和种质资源利用提供了有用的参考资料。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂及样品采集与基因组 DNA 提取
离心机为美国 BECKMAN 公司的 GS-15R 型超速

收稿日期: 2007-10-22 修订日期: 2008-12-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2004CB117405); 农业部“引进国际先进农业科学技术”计划 (水产主导品种分子标记辅助育种技术引进与水产育种技术平台的建立 No 2007-G-55); 黑龙江水产研究所基本科研专项 (2007HSYXZ-SJ-16) 资助

作者简介: 王洪哲 (1978—), 男, 汉族, 辽宁锦州人; 硕士研究生; 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: hongzhewang21@sina.com

通讯作者: 孙效文 (1955—), 男, 研究员, 博士生导师; 主要从事水产动物遗传育种研究。Tel: 0451-84862646; E-mail: sunxw2002@163.com

冷冻离心机; PCR 反应所用 DNA 扩增仪为美国 PE 公司 Gene Amp PCR System 9700 电泳采用北京六一仪器厂 DYY-Ⅲ型电泳仪槽, 美国 Bio-Rad 公司 164-5070 电泳仪; 凝胶成像系统为 Gene Company Limited 公司生产的 Gene Genius Bio imaging system 凝胶成像仪。生化试剂均购自美国 Promega 公司, 分子量标准为宝生物工程(大连)有限公司的 DL 2000 *Taq* DNA polymerase dNTP 购自哈尔滨 TaKaRa 公司, 其他试剂为国产分析纯。

实验用鱼取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所松浦实验场德国镜鲤选育系 F₂ 代自然产卵的两个同父异母半同胞家系, 随机选取 94 尾鱼, 家系 1(YJ) 和家系 2(EJ) 各 47 尾, 测量其体重、体长和全长等表型数据, 同时剪取每尾鱼部分尾鳍, 70% 酒精固定后带回实验室保存, 高分子量基因组 DNA 制备参考《分子克隆实验指南》(第二版)^[18], 略有改进。

1.2 引物筛选及扩增 本研究用于 2 个镜鲤家系遗传多态性分析的微卫星引物是本实验室用磁珠富集法克隆序列^[19] (引物信息可在本实验室的网站 www.fishbreeding.org 上查询) 和网站上搜索所获得的鲤鱼微卫星序列, 从中筛选出 24 对条带清晰、扩增稳定并且至少在一个家系中能扩增出多态性条带的引物用于镜鲤家系的遗传特异性分析(表 1)。本研究所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增反应均在 PE9700 型 PCR 仪上完成, 反应总体积为 25 μ L, 反应体系参见朱晓东等^[20], PCR 反应程序如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 39 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。每对微卫星引物复性温度(表 1)。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增反应产物, 5 V/cm 电泳 2 h 左右, Gold View 染色, Gene Genius Bio imaging System 记录电泳结果, Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析每个扩增条带的分子量。

表 1 24 对微卫星引物序列情况
Tab. 1 24 pairs of microsatellite marker sequence

Locus	Primer sequence	Repetitive sequence	Renaturation temperature (℃)	Locus	Primer sequence	Repetitive sequence	Renaturation Temperature (℃)
HLJ041	F:AGACCACCGCAGTAACAA R:GACTCACTCAGCACCAGA	(CA) ₂₄	53	HLJ518	F:CGACCGAACTCAGAACAC R:GAGCACCGCATTAACAGA	(CA) ₄₄	52
HLJ044	F:GTACAGCGTGACAGCATT R:AAGTTTCATCGGTGTCCTC	(CA) ₂₈	53	HLJ519	F:CTGCTGGCTTCTATTTATT R:GTGTTACTATGGCGGTGT	(CA) ₃₃	52
HLJ046	F:AACCCGAACTCACAAAC R:CACGGAAACTGAGAAGAC	(GT) ₁₄	53	HLJ527	F:CAGAGCCATTTTCAGTAGATT R:GGACAGATTTGACCCAGA	(TG) ₁₄	52
HLJ049	F:GATTTGTGCTCCTCAACC R:CTGTCACTTCTCCTTCCA	(GT) ₂₈	54	HLJ549	F:GCTAACTGCCATTCTTCTG R:CTGGGTTTCCACATCCTT	(CA) ₁₃	53
HLJ057	F:GAATGTCATGCGGTTTCAT R:TATTTGCTGGGTGTCCTC	(GT) ₂₃	51	HLJ555	F:TGACGGTGATACTTGTCG R:AACCACCTGTCGCTTCTA	(GT) ₁₅	53
HLJ133	F:TGGGTGTTGTACAGACA R:TTCAGCGGATTTACAGAGC	(GT) ₃₄	51	HLJ602	F:GTTCTGTGTTCTGTTGAG R:CCTGATGGAGCAAGTATG	(CA) ₁₉	52
HLJ319	F:CAGTGGGATTGTGGGAGT R:CAGGGAGGGTCAAAGGTC	(CA) ₁₄	53	HLJ752	F:CAGAAATGTGCTGTTGAA R:CTGGGAAAGTGCAAGTG	(GT) ₇	52
HLJ372	F:TCTACTTCTACCGCCACT R:GACTATTACCTGCATCTT	(GT) ₁₈	54	HLJ817	F:GACGATCCAGCAGCAATG R:CTCTTCCTAAAGCCTCAAA	(GT) ₂₂	48
HLJ376	F:AAGAAGGACTACGAGGAGA R:TTGCGGTGCTTACTATGA	(CA) ₁₃	54	HLJ848	F:GAGAACACGGCTGGATGG R:GTGGGTGTTTGAATTGAGAT	(CA) ₂₉	48
HLJ379	F:GGGGAGACGAGAAGTGCA R:AGCAGCTCTGTGGGCAAG	(CT) ₁₃ CG(CT) ₃	54	HLJ855	F:CGACCGAACTCAGAACAC R:GAGCACCGCATTAACAGA	(AC) ₄₄	48
HLJ392	F:GGCTACAAGGCAACACTG R:TGCGGTTAATGAGCTCTG	(CA) ₁₀	54	HLJ1230	F:TCACCTGACATCCCAACAGA R:GACGATCCGCTCTCAGAAAC	(CA) ₃₅	58
HLJ400	F:AAGAAGCCTCGGTCCTCC R:AAAGCCCAAAGCACATCA	(CA) ₂₂	51	HLJE8	F:ACCACTGAGCCCTTTACT R:GTGACCTCTGATTGACCC	(CT) ₈ (GT) ₁₃	52

1.3 数据统计与分析 微卫星是共显性遗传,可从琼脂糖凝胶电泳图谱上直接判断出个体的基因型^[21],用 PopGene(Version 3.2)软件计算各微卫星基因座的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、近交系数(F_{ST})、基因流(Nm)等遗传参数。根据 Botstein, *et al.*^[22]公式计算多态信息含量(PIC):

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

式中, P_i P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在家系中的频率, n 为等位基因数。然后运用 SPSS11.5统计分析软件的软件包 GIM 过程,编写程序对所研究的镜鲤家系进行各个不同微卫星座位不同基因型和对主要经济性状的效应分析。

本实验对其基因型效应进行分析的线性模型

如下:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

其中: Y_{ij} 为经济性状的表型值; μ 为家系均值; G_i 为标记的基因型效应; e_{ij} 为随机残差效应。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

24对微卫星分子标记在 2个镜鲤家系中经 PCR 特异扩增和 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后均可以表现出清晰的片段大小和一定的多态性,每个基因座的等位基因数为 1—6 不等,平均等位基因 3.21 个,片段长度在 134—371bp 之间,部分琼脂糖凝胶电泳结果(图 1、图 2)。

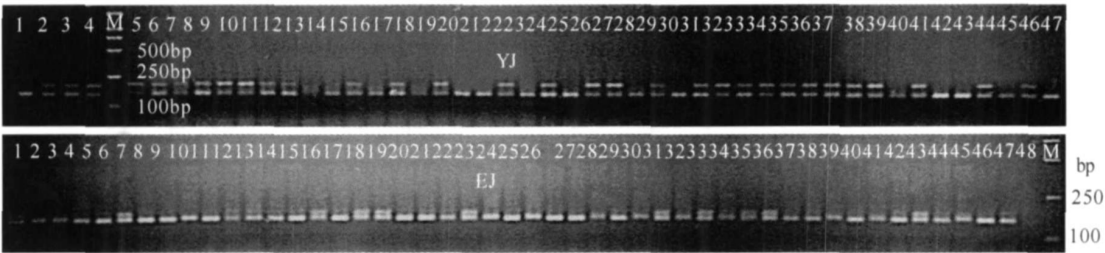


图1 镜鲤家系在 HLJE8 基因座的遗传差异

Fig.1 The genetic variation of HLJE8 among tow mirror carp families

YJ: 镜鲤家系 1; EJ: 表示镜鲤家系 2; M: 分子量标准 DL2000; 1-47: 47 个镜鲤个体; 48: 对照
YJ: Family 1; EJ: Family 2; M: DNA Marker DL2000; 1-47: 47 individuals of mirror carp family; 48: Blank

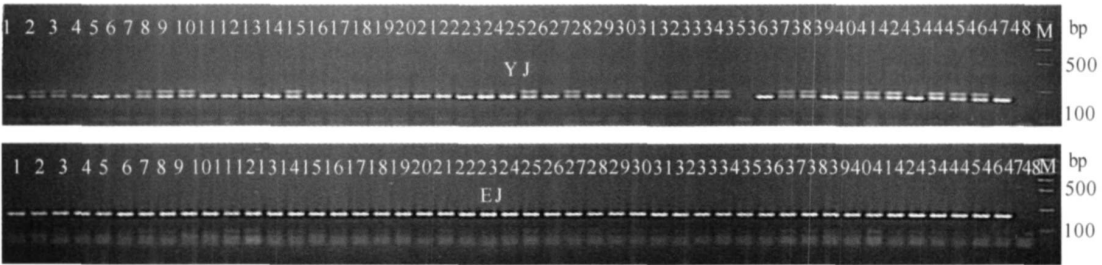


图2 镜鲤家系在 HLJ1230 基因座的遗传差异

Fig.2 The genetic variation of HLJ1230 among tow mirror carp families

YJ: 镜鲤家系 1; EJ:镜鲤家系 2; M: 分子量标准 DL2000; 1-47: 47 个镜鲤个体; 48: 对照
YJ: Family 1; EJ: Family 2; M: DNA Marker DL2000; 1-47: 47 individuals of mirror carp family; 48: Blank

2.2 家系遗传多样性分析

等位基因频率分析 在 2个镜鲤家系中,利用 24个微卫星 DNA 标记检测到 57个等位基因,有效等位基因数在 1.00—2.89,两家系中的平均值均为 1.89,等位基因的 频率大小在 0.0532—

1.0000。在同一微卫星座位上,2个镜鲤家系具有的等位基因数目和频率明显呈现出差异。其中有 28个等位基因为 2个家系所共有,29个等位基因具有家系特异性,如 HLJ049的 218和 178为 2个家系所共有;HLJ319的 325 310和 282 只出现在

EJ家系中, 而 26Q 242和 219只在 YJ家系中出现。从家系来看, YJ家系等位基因 54个; EJ家系等位基因 51个; 两个家系平均等位基因 52.5个(表 2)。

表 2 镜鲤家系在 24个微卫星座位中的等位基因频率
Tab. 2 Allele frequencies at 24 microsatellite loci of 2 German mirror carp families

Locus	Allele (bp)	Families		Locus	Allele (bp)	Families		Locus	Allele (bp)	Families	
		YJ	EJ			YJ	EJ			YJ	EJ
HLJ041	297	0.2447			357		0.0851	HLJ555	236		0.2660
	264	0.1277			342	1.0000			224		0.4681
	257	0.6277	1.0000		329		0.8191		286	0.2128	
HLJ044	345		0.1915	HLJ376	297	0.2553		HLJ602	292	0.5745	
	312		0.8085		265	0.7447			250	0.2128	1.0000
	261	0.4149			223		1.0000		290	0.6064	0.5106
HLJ046	245	0.2128		HLJ379	229		0.2660	HLJ752	267	0.3936	0.4894
	230	0.3723			186	1.0000	0.7340		297		0.4787
	258	0.2660	1.0000		178		0.2340		181	0.2128	0.5213
HLJ049	239	0.7340		HLJ392	158		0.2979	HLJ855	172	0.7872	
	255		0.2872		134	1.0000	0.4681		209	0.2872	
	218	0.6809	0.4255		364	0.1809	0.5000		181	0.4787	
HLJ057	178	0.3191	0.2872	HLJ400	343	0.2872	0.2660	HLJ1230	165	0.2340	0.2340
	297	0.2340			297	0.5319	0.2340		149		0.2872
	266	0.7660	1.0000		184	0.1489			135		0.4787
HLJ133	333		0.6383	HLJ518	172	0.5213		HLJ817	248	0.2021	
	310	0.8085	0.3617		160	0.3298	0.1489		235	0.7979	1.0000
	267	0.1915			145		0.8511		333	0.4255	0.2660
HLJ319	325		0.2979	HLJ519	346		0.3191	HLJ848	281	0.4043	
	310		0.4468		297	0.2872	0.6809		233	0.1702	0.7340
	282		0.2553		281	0.1915			300	0.5319	0.3404
HLJ372	260	0.3936		HLJ527	267	0.5213		HLJE8	279	0.4681	0.6596
	242	0.1383			185		0.2447		217	0.2979	
	219	0.4681			171	0.2872	0.2660		204		0.1170
	371		0.0957	HLJ549	158	0.7128	0.4894		189	0.0532	0.6064
					254	1.0000	0.2660		167	0.6489	0.2766

基因杂合度和微卫星座位的多态信息含量 从表 3可见, 在 2个镜鲤家系中, 利用 24个微卫星 DNA 标记检测到平均观测杂合度 0.00—0.83 平均值 0.46和 0.39, 无偏期望杂合度在 0.00—0.66 平均值 0.41和 0.38 平均多态信息含量在 0.00—0.58 平均值 0.35和 0.32, 说明这两个镜鲤家系属中度多态。

表 3 镜鲤家系在 24 个微卫星基因座的遗传多样性指数及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab 3 The polymorphic information and p -values at 24 microsatellite loci of 2 minor carp families

Locus	YJ					EJ				
	N_e	H_o	H_e	PIC	H-W (p)	N_e	H_o	H_e	PIC	H-W (p)
HLJ041	2.13	0.74	0.54	0.47	0.0011 **	1.00	0.00	0.00	0.00	-----
HLJ044	2.81	0.83	0.65	0.57	0.0000 **	1.45	0.38	0.31	0.26	0.1161
HLJ046	1.64	0.53	0.39	0.31	0.0153 *	1.00	0.00	0.00	0.00	-----
HLJ049	1.77	0.64	0.44	0.43	0.0016 **	2.89	0.57	0.66	0.58	0.0000 **
HLJ057	1.56	0.47	0.36	0.29	0.0415 *	1.00	0.00	0.00	0.00	-----
HLJ133	1.45	0.38	0.31	0.26	0.1161	1.86	0.47	0.47	0.36	0.9837
HLJ319	2.54	0.79	0.61	0.52	0.0000 **	2.83	0.81	0.65	0.57	0.0035 **
HLJ372	1.00	0.00	0.00	0.00	-----	1.45	0.36	0.32	0.29	0.0000 **
HLJ376	1.61	0.51	0.38	0.31	0.0219 *	1.00	0.00	0.00	0.00	-----
HLJ379	1.00	0.00	0.00	0.00	-----	1.64	0.53	0.39	0.31	0.0153 *
HLJ392	1.00	0.00	0.00	0.00	-----	2.76	0.47	0.64	0.56	0.0000 **
HLJ400	2.51	0.55	0.61	0.53	0.0000 **	2.66	1.00	0.63	0.55	0.0000 **
HLJ518	2.48	0.53	0.60	0.52	0.0004 **	1.34	0.30	0.26	0.22	0.2498
HLJ519	2.56	0.57	0.62	0.54	0.0000 **	1.77	0.64	0.44	0.34	0.0016 **
HLJ527	1.69	0.57	0.41	0.33	0.0069 **	2.70	0.49	0.64	0.56	0.0000 **
HLJ549	1.00	0.00	0.00	0.00	-----	2.77	0.53	0.65	0.57	0.0000 **
HLJ555	2.38	0.43	0.59	0.52	0.0000 **	1.00	0.00	0.00	0.00	-----
HLJ602	1.91	0.40	0.48	0.36	0.2606	2.00	0.60	0.51	0.37	0.2139
HLJ752	1.50	0.43	0.34	0.28	0.0720	2.00	0.36	0.50	0.37	0.0499 *
HLJ817	2.68	0.68	0.63	0.55	0.0000 **	1.64	0.53	0.39	0.31	0.0153 *
HLJ848	1.99	0.26	0.50	0.37	0.0006 **	1.82	0.68	0.45	0.35	0.0005 **
HLJ855	2.73	0.66	0.64	0.56	0.0035 **	2.73	0.47	0.64	0.56	0.0000 **
HLJ1230	1.48	0.40	0.33	0.27	0.0923	1.00	0.00	0.00	0.00	-----
HLJE8	1.95	0.66	0.45	0.41	0.0216 *	2.18	0.28	0.55	0.47	0.0000 **
Mean	1.89	0.46	0.41	0.35		1.89	0.39	0.38	0.32	

注: ---: 该基因座等位基因缺失 There is null allele at this locus; *: 显著偏离平衡 Significant deviation from equilibrium; **: 极显著偏离平衡 Terribly significant deviation from equilibrium

2.3 家系遗传平衡及遗传分化

用基于马尔可夫链模型 (Markov chain method) 的 Hardy-Weinberg 检验精确 p 值的无偏估测对单家系单基因座检测 (H-W test for each locus in each population), 结果发现, 2 个家系中分别有 12 和 11 个基因座对遗传平衡的偏离极显著 ($p < 0.01$), 说明家系内的基因型频率发生了较大改变 (表 3)。

用近交系数 (F_{ST}) 与基因流 (Nm) 分析这两个

家系间的遗传分化情况, 发现有 HLJ602、HLJ848 两个基因座近交系数小于 0.05, 其余 22 个基因座的近交系数均大于种群间无遗传分化的标准 ($F_{ST} = 0-0.05$)^[23], 各基因座的近交系数的均值为 0.2648, 基因流的均值为 0.6942, 说明绝大部分的遗传变异是来自群体之间, 体现出群体内部的遗传分化程度很低 (表 4)。

表 4 镜鲤家系在 24 个微卫星基因座的实测固定系数 (F_{st}) 和基因流 (N_m)

Tab. 4 The fixation indices (F_{st}) and gene flow (N_m) at 24 microsatellite loci of 2 mirror carp families

Locus	F_{st}	N_m	Locus	F_{st}	N_m	Locus	F_{st}	N_m
HLJ041	0.1685	1.2334	HLJ376	0.6805	0.1174	HLJ555	0.4620	0.2912
HLJ044	0.3543	0.4557	HLJ379	0.1534	1.3800	HLJ602	0.0093	26.6481
HLJ046	0.5798	0.1812	HLJ392	0.2507	0.7473	HLJ752	0.3614	0.4417
HLJ049	0.0639	3.6598	HLJ400	0.0723	3.2097	HLJ817	0.1995	1.0033
HLJ057	0.1325	1.6364	HLJ518	0.3818	0.4048	HLJ848	0.0373	6.4568
HLJ133	0.2944	0.5992	HLJ519	0.2131	0.9233	HLJ855	0.1974	1.0163
HLJ319	0.2295	0.8392	HLJ527	0.0504	4.7146	HLJ1230	0.1124	1.9737
HLJ372	0.4743	0.2771	HLJ549	0.3932	0.3858	HLJE8	0.2099	0.9408

注: $N_m = 0.25(1 - F_{st}) / F_{st}$

2.4 主要经济性状与基因座位、基因型及等位基因的相关分析

在 YJ 中, 以各种微卫星座位为标记效应组成固定模型, 用方差分析法对标记座位与主要经济性状进行连锁显著性检验, 确定了 HLJ519、HLJ848、HLJ855 和 HLJE8 四个标记座位与各主要经济性状具有显著相关, 对差异显著的标记进行不同基因型间的多重比较 (Duncan 法), 结果如下:

YJ 的 47 尾实验鱼平均体重、体长、全长分别为 64.77g、12.09cm、14.86cm, 与体重显著相关的基因位点为 HLJ519、HLJ848、HLJ855、HLJE8, 并且 HLJ519、HLJ848 和 HLJ855 这三个位点还与体长和全长显著相关。

在 HLJ519 座位下共检测到 301/267、281/281 和 267/267 三种基因型, 其中基因型 281/281 所对应的体长最大, 与基因型 301/267 相比差异显著 ($p < 0.05$), 与基因型 267/267 差异不显著, 并且基因型 281/281 所对应的体重和全长也最大, 与基因型 301/267 和 267/267 相比差异均显著, 而其他基因型中均不包含等位基因 281, 由此可以推断等位基因 281 可能与体重、体长和全长等主要经济性状的主效基因连锁。

在 HLJ848 座位下共检测到 300/300、300/279 和 279/279 三种基因型, 其中基因型 300/279 所对应的体重、体长和全长均最大, 与其他两种基因型相比差异显著, 并且基因型 300/300 个体的体重、体长和全长均值与其他两种基因型相比较低, 由此可以推断等位基因 279 可能与体重、体长和全长等主要经济性状的主效基因连锁。

在 HLJ855 座位下共检测到 209/181、209/165、181/181、181/165、165/165 五种基因型, 其中基因

型 209/165 所对应的体重、体长和全长均最大, 与基因型 165/165 相比差异显著, 与其他三种基因型相比差异不显著, 并且基因型 209/181 个体的体重、体长和全长均值与其他三种基因型相比较高, 由此可以推断等位基因 209 可能与体重、体长和全长等主要经济性状的主效基因连锁。

在 HLJE8 座位下共检测到 271/167、189/167 和 167/167 三种基因型, 其中基因型 189/167 所对应的体重最大, 与其他两种基因型相比差异显著 ($p < 0.05$), 并且基因型 189/167 所对应的体长和全长也最大, 但与其他两种基因型相比差异不显著 ($p > 0.05$), 由此可以推断等位基因 189 可能与体重、体长和全长等主要经济性状的主效基因连锁 (表 5)。

3 讨论

3.1 微卫星基因座的特异性分析

在本研究 24 个微卫星座位中有 HLJ041、HLJ046、HLJ057、HLJ372、HLJ376、HLJ392、HLJ379、HLJ549、HLJ555、HLJ1230 等 10 个座位在两个家系中的扩增情况差异较大 (图 1、图 2), 如基因座 HLJ041、HLJ046、HLJ057、HLJ072、HLJ079、HLJ555、HLJ1230 等在 YJ 中只扩增出一条带, 而在 EJ 家系中存在多态性, 说明在这些座位 YJ 的变异程度低于 EJ, 对于区分不同家系具有重要的指导作用, 是否可作为家系间的特异性标记还有待进一步验证。

3.2 镜鲤种群的遗传多样性水平分析

从遗传学角度而言, 一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。丰富的遗传多样性意味着比较高的适应生存潜力, 蕴藏着比较大的进化潜能以及丰富的育种和遗传改良潜力^[9]。

表 5 微卫星基因座不同基因型对 YJ 经济性状的多重比较
Tab 5 multiple comparisons of economic characters of YJ among microsatellite loci genotypes

基因座位	基因型	样本数	体重	体长	全长
Locus	Genotype	No.	Body weight	Body size	Whole size
HLJ519	301/267	27	61.77 ± 12.28 ^a	11.91 ± 0.79 ^a	14.64 ± 0.92 ^a
	281/281	9	74.89 ± 11.92 ^b	12.66 ± 0.77 ^b	15.56 ± 0.85 ^b
	267/267	10	62.20 ± 10.52 ^a	12.04 ± 0.83 ^{a,b}	14.78 ± 0.99 ^a
HLJ848	300/300	19	61.89 ± 13.29 ^a	11.87 ± 0.84 ^a	14.61 ± 1.00 ^a
	300/279	12	73.00 ± 12.69 ^b	12.67 ± 0.71 ^b	15.58 ± 0.76 ^b
	279/279	16	62.00 ± 9.91 ^a	11.93 ± 0.73 ^a	14.63 ± 0.83 ^a
HLJ855	209/181	18	64.67 ± 15.35 ^{a,b}	12.07 ± 0.87 ^{a,b}	14.83 ± 1.01 ^{a,b}
	209/165	7	68.86 ± 9.51 ^b	12.32 ± 0.82 ^b	15.09 ± 0.98 ^b
	181/181	11	66.18 ± 8.96 ^{a,b}	12.20 ± 0.60 ^{a,b}	15.03 ± 0.69 ^b
	181/165	4	64.00 ± 10.07 ^{a,b}	12.20 ± 0.99 ^{a,b}	14.98 ± 1.16 ^b
	165/165	5	52.40 ± 12.92 ^a	11.26 ± 0.84 ^a	13.86 ± 0.97 ^a
HLJE8	271/167	28	63.57 ± 12.51 ^a	12.04 ± 0.78 ^a	14.80 ± 0.91 ^a
	189/167	4	79.50 ± 13.70 ^b	12.73 ± 0.78 ^a	15.58 ± 0.87 ^a
	167/167	15	63.07 ± 11.26 ^a	12.02 ± 0.91 ^a	14.81 ± 1.08 ^a

注: 表内数据为样本平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$); 同列肩标字母不同表明差异显著 ($p < 0.05$)
Note Values in Tab. 5 are means ± standard deviation, superscript in the same column within the different means significant difference ($p < 0.05$)

Crawford *et al.*^[24]指出, 要保存尽量多的遗传多样性, 必须有可靠的方法对品种间的遗传分化进行测定, 微卫星标记技术是目前最佳的方法之一。本研究在 24 个微卫星 DNA 标记位点检测到 57 个等位基因, 有效等位基因数在 1.00—2.89, 两家系中的平均值均为 1.89, 等位基因的频率大小在 0.053—1.000, 部分等位基因的频率很低 (< 0.1000)。李俊清^[25]认为等位基因频率由于随机遗传漂变会发生变化, 尤其是频率较低的等位基因, 更容易丢失。为了维持较高的生物多样性, 必须保护低频率等位基因, 一个等位基因一旦固定, 便发生不可逆转的纯合性, 变化停止, 生存力下降。因此, 这些低频率等位基因在多样性保护方面更具重要意义。

多态信息含量 (PIC) 是等位基因频率和数目变化的函数, 反映出基因变异程度的高低, 是衡量位点多样性的另外一种较好的指标。根据 Bostein *et al.*^[22]提出的衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标, 本研究镜鲤基因座多态信息含量 0.00—0.58, 平均值为 0.33。基因杂合度又称基因多样性, 表示群体在某座位为杂合子的比例, 普遍认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数^[26]。在本研究的两个镜鲤家系中, 平均观测杂合度 0.00—0.83, 平均值 0.46 和 0.39, 无偏期望杂合度在 0.00—0.66, 平均值 0.41 和 0.38。刘臻等^[9]用微

卫星标记分析湘江野鲤养殖群体和自然群体, 湘江野鲤自然群体平均多态信息含量为 0.5347, 平均遗传杂合度为 0.5860, 养殖群体平均多态信息含量 0.5152, 平均遗传杂合度为 0.5688, 与之相比, 本研究结果遗传多样性相对较低。全迎春等^[8]选择微卫星标记检测黑龙江鲤、散鳞镜鲤、荷包红鲤抗寒品系、松浦鲤的平均观测杂合度为 0.36—0.43, 平均期望杂合度为 0.49—0.53, 平均多态信息含量为 0.21—0.25。本研究结果与以上研究结果相比基本一致, 说明基因座为中度多态基因座, 但呈现下滑趋势。分析其原因一方面可能是因为松浦实验场的德国镜鲤是较早培育的群体, 筛选的强度不够高, 还带有起始品种的一些杂合基因型来源, 也很可能是系统选育对遗传特性产生了影响; 另一方面可能是多态性检测方法不同, 物种本身的差别, 以及引入基础群体数量上的差异都会对该养殖物种遗传多样性是否下降的判定产生影响。

鱼类的遗传多样性是百万年来演替所致, 其影响因素是多方面的, 不仅受遗传学规律的控制, 且受外界环境的影响。目前鲤鱼养殖均采用半封闭型或封闭型养殖, 人为作用等能对遗传结构产生严重影响。为避免稀有等位基因在养殖种群中丢失, 建议加强对镜鲤的保种工作, 扩大群体数量, 避免近交, 通过提高不同来源的亲本数量及雄雌比例提高养殖群体的杂合度, 以保持其群体遗传多样性。若有效

种群小, 杂合性丧失率则高, 不利变异加大, 并且会加速群体退化, 有条件的地方可以利用分子标记进行检测后再进行选育, 以有效避免近亲繁殖带来的遗传衰退。

3.3 标记-性状连锁分析

好的遗传标记是镜鲤高效育种的基础。研究镜鲤遗传标记对主要经济性状的影响, 在其遗传育种中具有更加重要的意义。标记-性状连锁分析是根据标记位点的基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验, 差异显著则说明标记与数量性状存在关联^[27]。本研究共找到了 *HLJ519* *HLJ848* *HLJ855* 和 *HLJE8* 四个与镜鲤生长性状相关的遗传标记, 还发现了 *HLJ519* 基因座下的 281/281 *HLJ848* 基因座下的 300/279 *HLJ855* 基因座下的 209/165 *HLJE8* 基因座下的 189/167 这些对主要经济性状有利的基因型, 并推测出可能与体重、体长和全长等主要经济性状的主效基因连锁的等位基因。同时在这些位点与性状的连锁分析中发现了一个标记同几个主要经济性状相关, 或几个标记同一个主要经济性状相关的现象, 即一因多效或多因一效的现象, 说明了这些性状可能是由一个以上的 QTL 所控制。利用这些等位基因的遗传标记进行辅助选择能提高选择的准确性、缩短育种周期、增加选择差等, 可加速这些主要经济性状的遗传进展, 但由于这些标记没有在目前的 QTL 图谱上得到验证, 所以能否作为镜鲤主要经济性状选择的辅助标记, 实现从表型到基因型选择育种的转变, 还需进行更加深入的研究; 另外, 利用半同胞家系进行性状连锁分析, 其群体要大并尽可能地分析同一家系基因型的分离, 本研究中的样本数太少, 获得的连锁结果需要进一步验证。

参考文献:

- [1] Lins A M, Sprecher C J, Puers C, *et al* Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci by silver stain and fluorescence detection [J]. *Biotecniques*, 1996, **20**(5): 882—889
- [2] Edwards A, Hammond H A, Jin L, *et al* Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups [J]. *Genetics*, 1992, **12**(2): 241—253
- [3] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(1): 1—5 [孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱 (初报). 中国水产科学, 2000, **7**(1): 1—5]
- [4] Barendse W, Vainan D, Kemp S L, *et al* A medium density genetic linkage map of the bovine genome [J]. *Mammalian Genome*, 1997, **8**(1): 21—28
- [5] Lao X L, Yu X M, Tan D Q, *et al* Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River system [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 113—119 [廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 113—119]
- [6] Naish K A, Skibinski O. Tetranucleotide microsatellites loci for Indian major carp (Catlacatla) [J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, **53**: 886—889
- [7] Powell W, Morgante M, Andre C, *et al* The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Molecular Breeding*, 1996, **12**: 225—238
- [8] Quan Y C, Sun X W, Liang L Q. Microsatellite variation among four breeding populations of common carps [J]. *Zoological Research*, 2005, **26**(6): 595—602 [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. 动物学研究, 2005, **26**(6): 595—602]
- [9] Liu Z, Lu S Q, Kuang G Q, *et al* Microsatellite DNA analysis on genetic diversity of cultured and wild *Cyprinus carpio* populations in Xiangjiang River [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, **26**(7): 1074—1079 [刘臻, 鲁双庆, 匡刚桥, 等. 湘江野鲤养殖群体和自然群体遗传多样性的微卫星分析. 生态学杂志, 2007, **26**(7): 1074—1079]
- [10] Shen J B, Liu M H. Advance on common carp breeding [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 2000, 132—162 [沈俊宝, 刘明华. 鲤鱼育种研究. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2000, 132—162]
- [11] Li S F. The application of genetic theory and technique to the propagation of cyprinids [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1983, **7**(2): 175—184 [李思发. 遗传育种的理论和技术在鲤科鱼类养殖业中的应用. 水产学报, 1983, **7**(2): 175—184]
- [12] Alish R S, Takagi M, Dong S, *et al* Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Fisheries Science*, 1999, **65**(2): 235—239
- [13] Crooijans R P M A, Poel J J, Groenen M A M, *et al* Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Animal Genetics*, 1997, **28**: 129—134
- [14] 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**: 1144—1148
- [15] Mohindra V, Anshumala, Punia P, *et al* Microsatellite loci to determine population structure of Laboedero (*Cyprinidae*) [J]. *Aquatic Living Resource*, 2005, **18**: 83—85
- [16] Lal K K, Chauhan T, Mandal A, *et al* Identification of microsatellite DNA markers for population structure analysis in Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (Hamilton-Buchanan, 1882) [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2004, **20**(2): 87—91
- [17] Kohlmann K, Gross R, Murakawa A, *et al* Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations

- throughout the distribution range inferred from allozyme microsatellite and mitochondrial DNA markers [J]. *Aquatic Living Resources*, 2003, **16**: 421—431
- [18] J Sanbrook E F Fritsch T Maniatis (Jin D Y, Li M F, Hou L D Translation). Experimental directory of molecular clone (2nd ed). Beijing: Science Press 1999 [萨姆布鲁克 J 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫, 侯立德, 等译校). 分子克隆实验指南 (第 2 版). 北京: 科学出版社. 1999]
- [19] Sun X W, Jia Z Y, Wei D W, *et al* Comparison between magnetic beads enriched and small inserted fragment library for microsatellite sequences of common carp [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(2): 126—132 [孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究. 中国水产科学, 2005, **12**(2): 126—132]
- [20] Zhu X D, Geng B, Li J *et al* Analysis of genetic diversity among silver carp populations in the middle and lower Yangtze River using thirty microsatellite markers [J]. *Hereditas* (Beijing), 2007, **29**(6): 705—713 [朱晓东, 耿波, 李娇, 等. 利用 30 个微卫星标记分析长江中下游鲢群体的遗传多样性. 遗传, 2007, **29**(6): 705—713]
- [21] Quan Y C, Li D Y, Cao D C, *et al* Population genetic variation and structure analysis on five populations of mirror carp *Cyprinus carpio* L. using microsatellites [J]. *Hereditas* (Beijing), 2006, **28**(12): 1541—1548 [全迎春, 李天宇, 曹鼎辰, 等. 微卫星 DNA 标记探讨镜鲤的种群结构与遗传变异. 遗传, 2006, **28**(12): 1541—1548]
- [22] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**: 314—331
- [23] Wright Evolution and the genetics of populations University of Chicago Press 1978
- [24] Crawford A M, Littlejohn R P. The use of DNA marker in deciding conservation priorities in sheep and other livestock [J]. *Animal Genetic Resources Information*, 1998, **23**: 21—26
- [25] Li J Q. Conservation of plant genetic diversity and related molecular biological techniques [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 1994, **13**(6): 27—33 [李俊清. 植物遗传多样性保护及其分子生物学研究方法. 生态学杂志, 1994, **13**(6): 27—33]
- [26] Liang L Q, Chang Y M, Dong C Z Analysis of genetic diversity for *Coregonus ussuriensis* Berg in Heilongjiang River [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(6): 501—505 [梁利群, 常玉梅, 董崇智. 黑龙江乌苏里白鲑遗传多样性分析. 中国水产科学, 2004, **11**(6): 501—505]
- [27] Wang G F, Wu D J Correlation analysis of microsatellite DNA markers with wool traits in Lingshan semi-fine wool sheep [J]. *Hereditas* (Beijing), 2006, **8**(12): 1505—1512 [王高富, 吴登俊. 凉山半细毛羊微卫星标记与羊毛性状的相关分析. 遗传, 2006, **8**(12): 1505—1512]

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY AND ECONOMIC TRAITS IN TWO MIRROR CARP SEMI-SIB FAMILIES

WANG Hong-Zhe^{1,2}, ZHANG-Yan^{1,4}, YIN Qian-Qian^{1,3}, CAO Ding-Chen¹, SUN Xiao-Wen¹ and LIANG Li-Qun¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin 150070, China;

2. Tieling Fisheries Technical Extension Station, Tielin, 112000, China;

3. Life Science and Technology Institute, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

4. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract Mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) is one of the most important traditional domestic freshwater aquaculture fish in China. The seeding of mirror carp for aquaculture has come from the Heilongjiang River because germplasm resource of mirror carp is superior to those from other rivers and lakes. But advanced biological characteristic for aquaculture germplasm of mirror carp was obviously decreased during past years after multigeneration artificial propagation. The growth became slowly and the ability of antidisease reduced. Therefore, it is necessary to analyze and study genetic diversity and correlation analysis of microsatellite DNA markers with economic characters in mirror carp. In the present study, the genetic diversity and population structure of mirror carp from Heilongjiang River system were investigated using microsatellite DNA markers.

The genetic examination on 24 microsatellite markers and combined quantity characters such as the body weight, body length and full length was carried out among the random samples in two semi-sib families of mirror carp, a total of 57 different alleles were found and the number in each locus ranged from 1 to 6. The average number of alleles was 3.21. The DNA fragment lengths were from 134 bp to 371 bp. In the two semi-sib families, the number of mean valid alleles (N_e) was 1.00 to 2.89, the value of average observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.00 to 0.83 and

0.00 to 0.66 respectively and the mean *PI* was 0.00 to 0.58. The result showed that the level of genetic variability was moderate. Chi-square test was used to analyze the genotypes based on Hardy-Weinberg equilibrium, the *P* value denoted that the 2 families deviated equilibrium partially.

A GLM procedure was used to analyze the effects of these 24 microsatellites on economic characters. Results uncovered that there existed 4 loci *HLJ519*, *HLJ848*, *HLJ855* and *HLJE8* which had a significant impact on body weight ($p < 0.05$). The *HLJ519*, *HLJ848* and *HLJ855* loci correlated with length and full length character significantly ($p < 0.05$). Genotypes of that favorably affect economic characters were determined. Multiple comparisons of economic characters among microsatellite loci genotypes showed that allele 281 in locus *HLJ519*, allele 279 in locus *HLJ848*, allele 209 in locus *HLJ855* and allele 189 in locus *HLJE8* closely linked to the major gene related to body weight, body size and whole size of economic characters in mirror carp.

Key words Microsatellite marker; Mirror carp; Genetic diversity; Economic characters; Correlation analysis