

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01011

基于 26 个微卫星标记的三江水系草鱼遗传多样性分析

周盼^{1,2}, 张研¹, 徐鹏¹, 鲁翠云³, 孙效文^{1,3}

1. 中国水产科学研究院 水产生物应用基因组研究中心, 北京 100141;

2. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023;

3. 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: 选取 26 个微卫星标记对来自长江(监利、邗江)、黑龙江、珠江 3 个水系的 4 个野生草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)群体的遗传多样性进行了检测。结果表明, 26 个微卫星位点均为高度多态位点, 草鱼 4 个地理群体的多态信息含量(PIC)平均值为 0.581 3~0.638 6; 共检测出 141 个等位基因, 其中有 102 个为共有等位基因; 每个位点有等位基因 2~11 个, 平均等位基因 5.46, 平均有效等位基因 3.455 6。4 个地理群体野生草鱼的平均杂合度在 0.711 4~0.804 5 之间。群体间遗传固定指数(F_{ST})及 AMOVA 分析表明, 群体间遗传分化并不显著($F_{ST}=0.031\ 73$)。基于 DA 遗传距离构建的 UPGMA 聚类树表明, 监利群体与邗江群体这两个长江水系野生地理群体聚为一支, 然后与珠江群体聚为一支, 黑龙江群体单独聚为一支。长江群体是原始群体。综上所述, 三江水系野生草鱼具有较高的遗传多样性, 4 个群体之间遗传分化并不明显。

关键词: 草鱼; 微卫星; 野生群体; 遗传多样性

中图分类号: Q959; S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1011-10

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国的土著鱼类, 自然分布于长江、黑龙江及珠江等大型水系的流域中, 是一种重要的经济鱼类。起源于中国平原区的草鱼原种已分散到全国各个水域, 由于地理隔离, 形成不同的地理隔离种群^[1]。长江、珠江、黑龙江是中国目前草鱼的三大主要分布流域。长江流域草鱼资源最为丰富, 产卵场散布于从四川到安徽 700 km 长的干流江段, 以及汉江、湘江等主要支流; 黑龙江水系的草鱼, 是在第三纪上新世以前, 当嫩江与辽河、渤海相通的时候, 由江河平原区进入黑龙江水系而形成的黑龙江种群; 而珠江水系的草鱼则可能是当冰川期海平面较现在低 100 多米时, 由长江、钱塘江下游扩展过去而形成的珠江种群^[2]。

在 20 世纪 80 年代, 中国草鱼的生物资源非

常丰富^[1], 但由于生产上的过度捕捞和盲目近亲交配, 以及草鱼生境的破坏, 草鱼种质资源目前已出现严重退化。因此, 保留中国三大水系优良草鱼品种, 以及增加其生物多样性是解决草鱼种质资源退化的根本措施。目前, 针对长江水系的草鱼群体, 廖小林等^[3]利用 6 个微卫星标记研究了长江水系 4 个群体草鱼的遗传多样性; 张志伟等^[4]用 10 个微卫星标记对江苏境内 1 个草鱼野生群体和 2 个养殖群体的遗传多样性进行了分析。另外还采用同工酶^[5-6]、线粒体 DNA 酶切长度多态性标记(mtDNA-RFLP)^[2, 7]、随机扩增片段长度多态性标记(RAPD)^[8]、细胞色素 B 序列多态性^[9]等多种标记, 对不同区域的草鱼遗传多样性进行了研究。但是, 对黑龙江、长江、珠江三大水系草鱼群遗传多样性的比较研究还比较缺乏, 仅 20

收稿日期: 2010-12-13; 修订日期: 2011-02-25.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项项目(200903045).

作者简介: 周盼(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子遗传学研究. E-mail: xiaoxiao432432@163.com

通信作者: 孙效文, 研究员. E-mail: sunxw2002@163.com

世纪 80 年代赵金良等^[5]利用同工酶和形态标记对长江、珠江、黑龙江三大水系草鱼进行了分析,薛国雄等^[10]利用 RAPD 标记对长江、珠江和黑龙江草鱼群体进行了分析。但由于所用的标记类型不同,所得的结论并不一致。

微卫星分子标记是共显性标记,与其他分子标记相比特异性更高、可重复性更强。微卫星标记已被广泛应用到群体基因连锁与遗传图谱构建^[11]、群体遗传学研究^[12-14]、谱系和发育研究^[15-16]、疾病检测^[17]以及品种鉴定、亲本分析与个体、纯系检验等^[18-19]。为了调查珠江、黑龙江水系野生草鱼群体的遗传多样性状况及三大水系草鱼遗传多样性水平,本研究利用 26 个微卫星标记对黑龙江、长江、珠江三大水系共 4 个草鱼群体的遗传多样性及种质资源的特征进行了分析和研究,为进一步研究三江水系野生草鱼群体的遗传背景和种质资源的保护提供了一定得理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与 DNA 抽提

本实验 4 个野生草鱼群体共 119 尾,长江群体分别采自湖北监利(JL)老河长江家鱼原种场和江苏邗江(HJ)长江系家鱼原种场,黑龙江群体采自黑龙江(HLJ)抚远江段,珠江(ZJ)群体采自广东肇庆江段。具体信息见表 1。所有样本剪取尾鳍,置 95%酒精中保存。剪取新鲜的尾鳍条 5 mg 加入 0.5 mL 裂解液(0.5%的十二烷基酸钠; 200 μg/mL 蛋白酶 K; 0.01 mol/L EDTA),于 50℃的恒温水浴

锅中消化 1~2 h,并不时轻轻摇动至组织完全消化,加入等体积酚氯仿(苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)抽提 2 次,12 000 r/min, 4℃,离心 5 min,轻轻吸出上清,加入 1 mL 无水乙醇沉淀,12 000 r/min, 4℃,离心 20 min。去上清,沉淀用冷 70%乙醇洗涤 2 次,室温干燥之后,加入 100 μL 0.1×TE 溶解,于-20℃保存备用。

1.2 微卫星引物合成

利用本课题组自行开发的微卫星引物序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成 30 对引物,微卫星引物及筛选后的复性温度见表 2。

1.3 微卫星 PCR 扩增条件及产物检测

PCR 反应体系:反应体积为 20 μL,包含 10×PCR buffer 2 μL、dNTPs 2 μL (0.2 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶(1 U)、DNA 模板 2 μL(10~50 ng/μL),补充 ddH₂O 至总体积 20 μL。PCR 反应程序:94℃预变性 5 min,然后 30 个循环,每个循环包含 94℃变性 30 s, 51~55℃复性 30 s(复性温度见表 2), 72℃延伸 30 s,循环结束后 72℃延伸 10 min。反应产物 4℃保存直至电泳分析。PCR 扩增产物检测:先用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测引物扩增情况,对于有良好扩增条带的引物,用 10%的非变性聚丙烯酰胺凝胶在 120 V 电压下电泳,银染显色。将固定后的聚丙烯酰胺凝胶放入凝胶成像系统或凝胶扫描仪拍照或扫描,根据电泳条带位置的不同确定其基因型,并以分子量标准 DL2000 为对照,使用 Gel-pro Analyzer 4.5 软件分析数据。

表 1 4 个地理群体草鱼采集地点及基本信息
Tab. 1 Sampling sites and information of the grass carp samples

种群 population	采集地点 sampling site	尾数 no.	个体规格/kg specification	代号 symbol
黑龙江群体 Heilongjiang population	黑龙江抚远江段 Fuyuan river reach of Heilongjiang	30	0.46~0.85	HLJ
长江, 监利群体 Jianli population in Yangze River	湖北监利四大家鱼原种场 Chinese carps original breeding farm in JianLi city	29	0.50~0.88	JL
长江, 邗江群体 Hanjiang population in Yangze River	江苏邗江四大家鱼原种场 Chinese carps original breeding farm in HanJiang city	30	0.52~0.90	HJ
珠江群体 Zhujiang population	广东肇庆江段 Zhaoqing river reach of Guangdong	30	0.50~0.89	ZJ

表 2 微卫星标记引物序列、退火温度及片段大小

Tab.2 Primer sequences, annealing temperature and fragment size of the microsatellite makers

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	片段大小/bp fragment size
HLJC-2F	CAGATGAGAGAGGGGGAGGT	59	219-240
HLJC-2R	AACAAGGCTGTTGTCCTGC		
HLJC-3F	ATGTCTGGGCATTTGCTTCT	59	160-177
HLJC-3R	GGTAACGCACAGGTCTCACA		
HLJC-4F	GGCCTCTCAGTGCTCAAAAC	60	152-197
HLJC-4R	ACCCACTTCTGCATGGTTTC		
HLJC-8F	GAGCTTCAGTGCTGTCCAG	60	229-240
HLJC-8R	GGGATTAATGGAGCCAGGTT		
HLJC-9F	TTGAAGAGGGCCAATGGTTA	55	202-226
HLJC-9R	TGCACGACACAACATGAAAA		
HLJC-10F	GAACGCACCCTCTCCATCTA	60	186-197
HLJC-10R	ACACGTCCTTGGGCAAATAG		
HLJC-14F	GGCTTCTCCATCACCATCTC	60	223-236
HLJC-14R	TCAGTTGTTCTGGCTGTCCA		
HLJC-20F	TCAGTTGTTCTGGCTGTCCA	60	167-192
HLJC-20R	AGAGACATGCCCTCTTTTGG		
HLJC-26F	GCTGAACGCAAAACATGAGA	56	205-223
HLJC-26R	GTAAAGCCCATGCTGCAAT		
HLJC-27F	CCTTGTCTTGTGGGAACAT	60	199-213
HLJC-27R	ATCTCACCTCCCCAGGTCTT		
HLJC-29F	AAAAGTGGTGGGAATGCTG	55	230-251
HLJC-29R	TTTCTGGAGGGTCTGATG		
HLJC-32F	CTACCAGAGCGATGAGGACA	60	166-180
HLJC-32R	TGCTAGTGGGAAATGCTGGT		
HLJC-33F	GCGAGGGAGATAGAGGTGTG	61	127-141
HLJC-33R	GCGAGTGTAAGGGCATCATT		
HLJC-36F	GGGACTGATGTGTTTCTCTTCC	60	198-220
HLJC-36R	GAGAGGAATCTGTGGGGTGA		
HLJC-38F	GTGACCAAGATGCCGAACTT	57	154-165
HLJC-38R	TGGCAAGATTGGAAATTGA		
HLJC-40F	GTAAAGCCCATGCTGCAAT	56	127-144
HLJC-40R	GCTGAACGCAAAACATGAGA		
HLJC-48F	TTCACGTGTCGCTTAACAGC	58	150-171
HLJC-48R	GCGCATGAACGACTTTCTCT		
HLJC-52F	GTAAAGCCCATGCTGCAAT	56	210-231
HLJC-52R	GCTGAACGCAAAACATGAGA		
HLJC57- F	GACCTGGCCTGTGTTCTCT	59	140-210
HLJC57- R	TCGACGATCTCTGCATCATC		
HLJC66- F	GATTGAAAGCCCCACATGAT	59	261-283
HLJC66- R	CACGTTTCTCGGTCCTGTA		
HLJC67- F	TGTTAGCGGAAGCTGAGACA	59	248-265
HLJC67- R	GTCCTCACCCACTGCATTTT		
HLJC72- F	AGAGAGCAGCCGTTGACACT	60	167-191
HLJC72- R	TACTCCCCAGCTGTTTCCTG		

续表 2

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	片段大小/bp Fragment size
HLJC81- F	CCAGCTTCTGCCTTACCATC	59	153-161
HLJC81- R	TGCATTTTCGTTGGACACAT		
HLJC88- F	TCCAGATGCAGCTCACTTGT	58	224-245
HLJC88- R	ACCCCGTTGGAGTTTTTCTC		
HLJC91- F	TGGAGAAAAGGGCTGTAGGA	59	201-221
HLJC91- R	ACTCCCCCTCCCTTCCTCATA		
HLJC104- F	GACCCACCACTTACATCCAAA	59	198-213
HLJC104- R	GGCTACAGAAGGGAATGTGG		
HLJC107- F	GCAAGCTGCATTCACTCTGA	58	221-245
HLJC107- R	TGGAGAAAAGGGCTGTAGGA		
HLJC111- F	GCAAAGCAAAACACAGCAAA	59	287-301
HLJC111- R	CGACGATCTGTCCATCAGTG		
HLJC115- F	AAATGCCGTCCAGTGAGTCT	58	166-188
HLJC115- R	TCAGCCTGCACATAACAAAGA		
HLJC116- F	TGGTTGGACAGCAAACAAAG	58	154-177
HLJC116- R	TGAAGGTCTGGCTGATGATG		
HLJC118- F	ACAGCACATTCAGGGAGGAC	60	128-144
HLJC118- R	AGCAAAGCAGCAAACCTCTC		
HLJC119- F	AGACAAATGGACGGACGAAC	60	211-231
HLJC119- R	TGACACTGAAGACTGGACTGG		

注: F-正向引物; R-反向引物。
Note: F-forward primer, R-reverse primer.

1.4 数据统计与分析

对聚丙烯酰胺凝胶上出现的条带进行统计, 将每一条带视为该位点的 1 个等位基因来处理, 利用 PopGene32 (Version 1.31)进行分析, 计算并统计 26 个微卫星基因座位的观测等位基因数(observed number of alleles, A)、有效等位基因数(effective number of alleles, N_E)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、遗传相似系数(genetic similarity index, D)、群体间遗传距离(genetic deviation index, D)和多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。衡量杂合子缺失或杂合子过剩的 D 值的计算公式如下:

$$D = (H_o - H_e) / H_e$$

利用 Arlequin3.5^[20]软件计算种群间的遗传距离和估计种群间的遗传固定指数(F_{ST}), 分析群体内和群体间的分子方差(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)。利用 MEGA 4.0^[21]软件计算

群体间的遗传距离。

采用 PopGene^[22]计算 Nei's 氏遗传距离, 再以 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arith-mefic means, 类平均法)算法进行聚类分析, 用 TreeView (Win32)软件读取所生成的系统发生树。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及电泳检测结果

26 个微卫星位点在 4 个野生草鱼种群中经 PCR 特异性扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测后, 均呈现清晰的目的片段, 图 1 为 HLJ57 位点在 4 个群体中的部分聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

2.2 种群遗传多样性分析与哈迪-温伯格平衡检验

各微卫星标记的引物、PCR 扩增条件、等位基因大小和数量等参数见表 3。由表 3 可知, 本研究所选用的 26 个微卫星标记在 4 个群体中均表现为多态。26 个微卫星标记在 4 个群体中共检测到

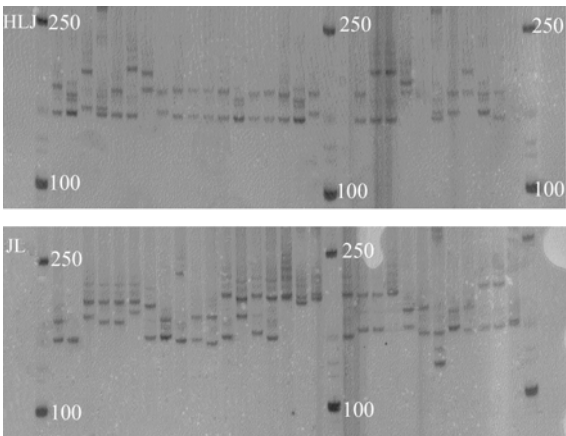


图 1 引物 HLJ57 在 2 个草鱼群体中的 PCR 扩增结果
HLJ: 黑龙江群体, JL: 长江监利群体.
Fig.1 Amplification results by loci *HLJ57* in two *Ctenopharyngodon idellus* populations
HLJ: Heilongjiang population; JL: Jianli population in Yangtze River.

141 个等位基因, 其中在黑龙江群体有 132 个, 监利群体 149 个, 邗江群体 141 个, 珠江群体 142 个, 其中, 102 个等位基因为 4 个群体所共有。

26 个微卫星位点在相同草鱼群体, 以及相同微卫星位点在不同草鱼群体中变异程度均有较大差异。4 个群体的平均观测杂合度分别为 0.711 4、0.804 5、0.776 8 和 0.784 0, 平均期望杂合度分别为 0.624 5、0.673 9、0.662 3 和 0.634 9, 其中, 长江流域监利群体的观测杂合度和期望杂合度均为最高。26 个位点中, 各草鱼群体内的多态信息含量平均值为 0.581 3(HLJ)~0.638 6(HJ), 均表现为高度多态, 其多态性由高到低依次为: HJ (0.638 6)、JL (0.636 0)、ZJ (0.594 4)和 HLJ (0.581 3), 这说明 4 个草鱼野生群体具有比较丰富的遗传多样性。

通过基因型的 *P* 值检验, 三大水系 4 个草鱼群体的哈迪-温伯格平衡均发生了不同程度的偏离 (表 4), 黑龙江、监利、邗江、珠江草鱼群体分别有 14、16、11、15 个座位符合哈迪-温伯格平衡 ($P>0.05$)。

2.3 种群遗传分化

基于等位基因频率计算出草鱼各群体间的 Nei's 遗传距离如表 5 所示, 邗江群体与监利群体间遗传距离最近 ($D = 0.043\ 0$), 黑龙江群体与珠

江群体遗传距离最远 ($D = 0.095\ 6$); 4 个群体在 26 个座位上的平均遗传固定指数如表 5 所示, 邗江与监利群体遗传固定指数最小 ($F_{ST} = 0.010\ 3$), 珠江与黑龙江群体遗传固定指数最大 ($F_{ST} = 0.040\ 0$,

表 3 26 个微卫星标记在 4 个群体的遗传特性
Tab. 3 Genetic characteristics of 26 microsatellite loci in four grass carp populations

位点 locus	A	N_e	H_o	H_e	PIC
HLJC02	6	2.962	0.3348	0.6516	0.5987
HLJC03	5	3.0249	0.3277	0.6422	0.6091
HLJC04	7	1.8368	0.5425	0.4455	0.4322
HLJC08	4	2.7829	0.3566	0.6361	0.5715
HLJC09	4	3.2836	0.3015	0.673	0.6371
HLJC10	7	3.4943	0.2831	0.6975	0.6701
HLJC14	7	3.936	0.2508	0.734	0.7026
HLJC20	6	4.2645	0.2312	0.7194	0.7292
HLJC26	10	6.0355	0.1621	0.8169	0.8127
HLJC27	6	3.8564	0.256	0.7207	0.6977
HLJC29	6	1.2895	0.7746	0.2189	0.2177
HLJC32	5	1.4227	0.7016	0.2875	0.2819
HLJC33	7	3.6545	0.2705	0.7087	0.6887
HLJC36	7	4.1825	0.2358	0.7269	0.7303
HLJC38	3	2.2075	0.4507	0.4635	0.4491
HLJC40	5	4.6877	0.2097	0.7357	0.7524
HLJC48	8	1.5635	0.638	0.3477	0.3451
HLJC57	11	5.455	0.1798	0.7954	0.7924
HLJC72	11	7.8607	0.1235	0.8446	0.8594
HLJC81	10	5.1673	0.1901	0.7935	0.7822
HLJC91	8	4.4984	0.219	0.7683	0.7429
HLJC104	7	4.2146	0.2341	0.7102	0.7308
HLJC107	9	5.1948	0.1891	0.7796	0.7824
HLJC115	7	4.7452	0.2072	0.7631	0.7575
HLJC116	7	3.4388	0.2878	0.698	0.6618
HLJC119	7	2.1333	0.4665	0.4926	0.5013
黑龙江 HLJ	5.07	3.1973	0.7114	0.6245	0.5813
邗江 HJ	5.42	3.5051	0.6386	0.7768	0.6386
监利 JL	5.73	3.7558	0.636	0.8045	0.6739
珠江 ZJ	5.46	3.3643	0.784	0.6349	0.5944

注: A—等位基因数, N_e —有效等位基因数, H_o —观测杂合度, H_e —期望杂合度, PIC—多态信息含量。
Note: A—observed number of alleles, N_e —effective number of alleles, H_o —observed heterozygosity, H_e —expected heterozygosity, PIC—polymorphism information content.

表 4 草鱼 4 个群体基因型哈迪-温伯格平衡的卡方检验
Tab. 4 Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium of genotypes in the four grass carp populations

位点 locus	群体 population			
	黑龙江 HLJ	邗江 HJ	监利 JL	珠江 ZJ
HLJC02	0.0065	0.0003	0.0501	0.0022
HLJC03	0.5661	0.0337	0.0073	0.0233
HLJC04	0.1557	0.0033	0.0001	0.0000
HLJC08	0.3176	0.0026	0.0010	0.0000
HLJC09	0.0158	0.0063	0.0005	0.0002
HLJC10	0.0000	0.9207	0.0000	0.0000
HLJC14	0.0142	0.2102	0.0002	0.1636
HLJC20	0.3818	0.4638	0.7834	0.3270
HLJC26	0.0474	0.0000	0.1041	0.5264
HLJC27	0.0206	0.0028	0.0641	0.0154
HLJC29	0.9994	0.0431	0.1967	0.0198
HLJC32	0.7730	0.0000	0.3878	0.9963
HLJC33	0.0089	0.1409	0.0625	0.0042
HLJC36	0.0000	0.0122	0.4482	0.5136
HLJC38	0.2112	0.3138	0.4178	0.9654
HLJC40	0.8416	0.4413	0.1916	0.0834
HLJC48	0.0000	0.1900	0.2448	0.7670
HLJC57	0.1050	0.0623	0.5169	0.4277
HLJC72	0.0062	0.0001	0.0000	0.0000
HLJC81	0.0000	0.0147	0.0087	0.5410
HLJC91	0.1420	0.0500	0.1195	0.1718
HLJC104	0.9343	0.0003	0.0000	0.0000
HLJC107	0.3034	0.0257	0.0006	0.4454
HLJC115	0.0288	0.0039	0.2885	0.5316
HLJC116	0.4313	0.0915	0.2255	0.2640
HLJC119	0.3636	0.6453	0.9941	1.0000

且 4 个群体间遗传固定指数差异极显著($P < 0.01$)。
4 个群体间遗传变异的 AMOVA 分析结果如表 6

表 6 4 个草鱼野生种群间和种群内的分子变异方差分析
Tab.6 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among four grass carp populations

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum square	方差分量 variance component	方差分量百分率/% percentage of variation	遗传固定指数 F_{ST}	P
群体间 among populations	3	60.185	0.23884	3.17	0.03173	0.003
群体内 within populations	115	672.975	1.43537	19.07		
个体间 within individuals	119	1038	8.72269	115.9		

所示, 群体间的遗传变异占总变异量的 3.17%, 且达到极显著水平($P < 0.01$)。

根据表 5 所列的遗传距离矩阵, 对 4 个群体进行 UPGMA(Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average)聚类分析, 聚类结果如图 2 所示。由图可知, 监利群体和邗江群体聚为一支, 然后再与珠江群体聚为一支, 黑龙江群体单独聚为一支。

表 5 4 个草鱼群体间的遗传固定指数(F_{ST} , 对角线下)和遗传距离(D , 对角线上)

群体 population	黑龙江 HLJ	监利 JL	珠江 ZJ	邗江 HJ
黑龙江 HLJ		0.0871	0.0948	0.0814
监利 JL	0.0370		0.0956	0.0430
珠江 ZJ	0.0400	0.0355		0.0728
邗江 HJ	0.0282	0.0103	0.0199	

通过 MEGA 软件得到群体所有个体的系统发生关系结构图(图 3), 图中可以看出, 黑龙江群体的大部分个体较为聚拢, 长江流域两个群体的个体分布的比较分散, 而珠江个体也与其他群体的区分并不明显。

3 讨论

3.1 4 个地理群体的遗传多样性

与同工酶、mtDNA、RAPD 等标记相比较, 微卫星标记检测的遗传变异性明显高于其他标记^[23-24]; 同时, 由于微卫星标记遵循孟德尔定律呈共显性遗传, 在寻找特异性标记、家系分析方面更显现了独到的优势^[24]。本研究运用 26 对微

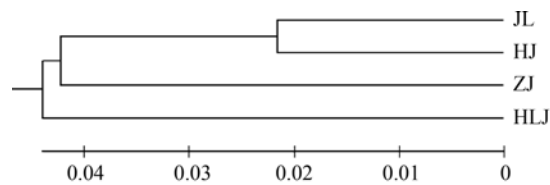


图 2 基于标准遗传距离的 4 个草鱼群体 UPGMA 聚类图
HLJ—黑龙江群体; HJ—邗江群体; JL—监利群体; ZJ—珠江群体.
Fig.2 UPGMA clustering tree based on genetic distance
HLJ—Heilongjiang population; HJ—Hanjiang population;
JL—Jianli population; ZJ—Zhujiang population.

卫星标记对 4 个草鱼野生群体遗传多样性进行了比较, 26 个微卫星位点上共检测到 141 个等位基因, 每个座位检测到的等位基因数为 2~11 个, 除了少数几个座位的等位基因数较少外, 其余座位均为 4 个以上。其中, 102 个等位基因为 4 个群体所共有, 它们是草鱼进化过程中最原始最保守

的一部分等位基因, 对于维持草鱼物种的稳定有着重要的意义。其余等位基因则是在进化过程中由于插入、缺失等突变机制所造成的。

多态信息含量(PIC)是群体内遗传变异的量度, 可以用来描述微卫星位点的变异程度。依 Botstein 等^[25]的划分标准: 当 $PIC>0.5$ 时, 该位点为高度多态位点; 当 $0.25<PIC<0.5$ 时, 为中度多态性位点; 当 $PIC<0.25$ 时, 为低度多态位点。本试验中有 5 个座位为中度多态位点, 其余 21 个座位均为高度多态位点, 4 个群体的多态信息含量范围为 0.581 3~0.638 6, 说明 4 个草鱼野生群体都具有丰富的遗传多样性。

在一个相对大而稳定的群体中, 基因型在所有位点上均符合哈迪-温伯格平衡定律, 可以利用 Nei's 的期望杂合度公式来估算杂合度。等位

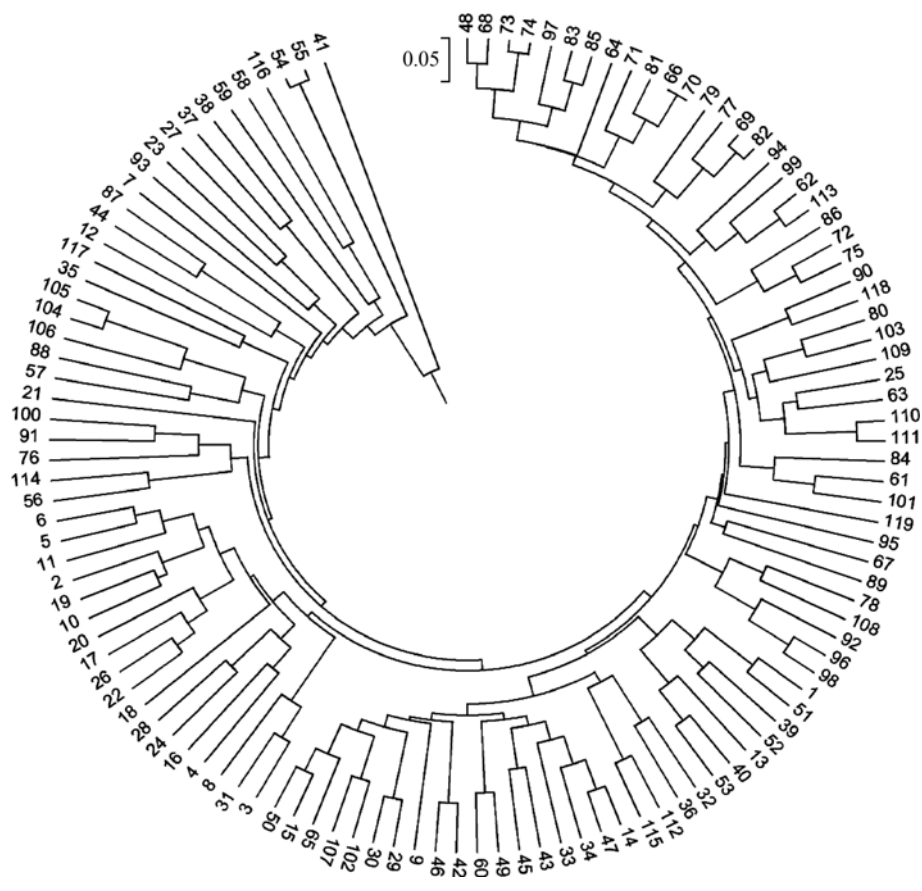


图 3 草鱼各群体系统发生关系环状结构图
1-30 为黑龙江群体, 31-60 为长江监利群体, 61-89 为长江邗江群体, 90-119 为珠江群体.
Fig.3 Circle phylogenetic tree in the grass carp populations
1-30 belong to HLJ population, 31-60 belong to JL population, 61-89 belong to HJ population, 90-119 belong to ZJ population.

基因的结构对群体的平均杂合度有一定的影响, 在一个基因位点上杂合基因型所占的比例取决于等位基因的结构。群体平均基因杂合度表示在被检测位点上群体中杂合子的频率, 它是衡量群体杂合程度的指标。群体平均基因杂合度越低, 该群体的遗传一致性越高, 即群体的遗传多样性越低。本研究结果表明在 4 个不同草鱼地理种群中, 26 个多态微卫星标记的基因杂合度在 0.711 4~0.804 5 之间变动。三江群体的平均杂合度由大到小顺序为: 长江、珠江、珠江, 这与李思发等^[26]的研究结果一致。4 个群体的观测杂合度和预测杂合度分析结果较为一致。其中, 邗江群体草鱼的平均基因杂合度最高, 为 0.804 5, 说明邗江草鱼群体遗传多态性丰富, 同时说明, 该群体还可进一步进行纯种选育, 以提高群体的整齐度和生产性能; 黑龙江草鱼群体的平均基因杂合度稍低, 为 0.711 4, 说明黑龙江群体遗传多样性水平较低。4 个草鱼野生群体的平均基因杂合度均在 0.7 以上, 杂合度较高, 说明草鱼的遗传多样性较高。虽然目前环境污染, 水利工程, 人工繁殖等对种群遗传结构的改变有重大的影响, 但由于草鱼较强的抗逆能力, 使得草鱼遗传多样性并未受到太大的影响, 这与吴力钊等^[6]用同工酶研究的草鱼多样性结果一致。而张四明等^[8, 27]应用线粒体 DNA 和 RAPD 发现草鱼遗传多样性较低, 赵金良等^[5]用同工酶分析草鱼多样性也较低, 可能是由于本实验采用 26 个微卫星位点, 每个群体采集 30 个个体(珠江 29 个个体), 所选用的微卫星座位也均为高度多态位点, 这些都使得本实验得到的遗传多样性更高。

3.2 群体间的遗传变异

遗传固定指数(F_{ST})值是衡量群体间遗传分化程度的重要参数。从 4 个群体间 F_{ST} 来看, 群体间 F_{ST} 介于 0.010 3~0.040 0 之间, 属于低等程度($0.05 < F_{ST} < 0.15$)^[27]的遗传分化, 表明三大水系的草鱼野生群体并没有产生明显的遗传分化; 通过 AMOVA 对变异来源的剖分表明, 群体间变异仅占总变异的 3.17%, 大部分的变异来自于群体内。经过长期的地理隔离, 三大水系的野生草鱼虽然产生了部

分遗传分化, 但是这种分化并不明显, 这也有表明中国草鱼野生种之间并没有发生过多的近交。

根据 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 树, 4 个草鱼群体聚成了两支, 其中长江流域监利群体与邗江群体聚成一支, 然后与珠江群体聚在一起, 黑龙江群体单独聚为一支。本实验中从微卫星实验数据分析而得到的遗传距离树状图与经典的形态分析, 特别是作为遗传指标的同工酶以及 RAPD 的分析结果基本上是一致的, 即长江水系湖北监利群体与江苏邗江群体的遗传距离最小, 主要原因可能是它们都属于长江水系, 这同时也说明长江流域草鱼的遗传变异均发生在种群内而非群体间, 廖小林等^[3]的微卫星研究结果也显示, 长江水系草鱼的遗传分化很微弱。此外, 本研究中黑龙江种群与其余三者遗传距离最大, 长江与珠江种群间的遗传距离次之。草鱼起源于第三纪的中国东部平原, 由于当时渤海还没有陷落, 当时的古辽河是古黄河的北侧支流, 这使草鱼先经渤海平原再由古辽河这一路线进入东北平原区; 由于近海区和台湾海峡经历过低海水位的平原时期, 长江流域的四大家鱼循此路线进入珠江水系和南越地区。由于地形与生态环境条件的变化形成了地理隔离, 便分别在不同水系里形成遗传性能上互有差别的孟德尔繁育群体。由于黑龙江地处高纬度地区, 其地理条件与长江和珠江存在很大的差异, 这可能是造成黑龙江草鱼差别比较大的原因。黑龙江中的草鱼种群位于其自然分布区的最北端, 属于地理分布上的边缘群体, 而长江、珠江水系的草鱼种群属于中央群体, 所以后两者遗传距离较近^[10]。同时也表明, 长江群体是较为原始的群体。

由 Mega 软件所得到的系统发生关系结构图(图 3)表明, 黑龙江大部分个体是聚为一支的, 这可能是由于长期的地理隔离导致形成了 1 个地理单元, 41 号个体位于进化最原始的位置, 其属于长江水系, 这也与聚类分析所得的结果一致。长江水系两个群体的个体分布得比较分散, 表明他们之间的遗传距离较近, 并没有产生明显的遗传分化。其原因可能是由于长江流域经常性的洪水

及历史上的河流改道等原因, 抵消了可能发生的群体分化。珠江水系个体与其他两大水系的个体也没有明显的分化, 表明该群体还处在进化过程中。

Crawford 等^[29]指出若要保持尽量多的遗传多样性, 要用可靠的方法来研究品种间的遗传分化, 微卫星等位标记分析是最佳的方法之一。利用微卫星得出的遗传距离更能反映分化时间的长短, 客观地反映品种间的遗传变异和分化, 而微卫星标记的选择以及样本量的大小又对遗传多样性评估的准确性有着重大的影响。闫路娜等^[30]分析了 8 个微卫星位点样本量对各种遗传多样性指标的影响, 认为样本大小与所观测到的等位基因数呈正相关, 而与期望杂合度无显著相关。对于种群遗传和分子生态学研究, 30~50 个个体是微卫星 DNA 分析所需的最小样本量; 而包文斌等^[31]用 29 个微卫星标记的研究结果则认为样本量在 20~25 较为适宜。本研究不论从样本量还是从标记的数量上都是符合标准的, 而且本研究采用聚丙烯酰胺电泳银染法来检测 SSR 的扩增结果, 灵敏度和分辨率都很高, 且价格便宜, 更容易得到广泛的推广。本研究所选用的微卫星座位平均多态信息含量均在 0.5 以上, 为高度多态位点, 适于种质资源的鉴定研究。

参考文献:

- [1] 李思发. 长江, 珠江, 黑龙江鲢, 鳙, 草鱼种质资源研究[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [2] 李思发, 吕国庆. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.
- [3] 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[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 113-119.
- [4] 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.
- [5] 赵金良, 李思发. 长江中下游鲢, 鳙, 草鱼, 青鱼种群分化的同工酶分析[J]. 水产学报, 1996, 20(2): 104-110.
- [6] 吴力钊, 王祖熊. 长江中游草鱼天然种群的生化遗传结构及变异[J]. 遗传学报, 1992, 19(3): 221-227.
- [7] 吴海防, 董仕, 单淇, 等. 3 个群体草鱼 mtDNA D-Loop 的 PCR-RFLP 分析[J]. 水产科学, 2006, 25(4): 184-188.
- [8] 张四明, 邓怀, 汪登强. 长江水系钱草鱼遗传结构及变异的 RAPD 研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 324-330.
- [9] 叶星, 白俊杰, 劳海华. 草鱼线粒体细胞色素 b 基因的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 193-197.
- [10] 薛国雄, 刘棘, 刘洁. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 1998, 5(1): 1-5.
- [11] Miyao A, Zhong H S, Monna L, et al. Characterization and genetic mapping of simple sequence repeats in the rice genome[J]. DNA Res, 1996, 3(4): 233.
- [12] 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(3-4): 247-264.
- [13] 郭昱嵩, 王中铎, 刘楚吾, 等. 勒氏笛鲷微卫星位点的筛选及特征分析[J]. 遗传, 2007(3): 355-359.
- [14] 刘丽, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 22-29.
- [15] 董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 9 种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析[J]. 遗传, 2007(7): 837-843.
- [16] Bierre N, Launey S, Naciri-Graven Y, et al. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae[J]. Genetics, 1998, 148(4): 1893.
- [17] Kim H S, Lee B L, Woo D K, et al. Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms[J]. Cancer Lett, 2001, 164(1): 61-68.
- [18] Stockburge E M, Green R D, Wood W O, et al. Determination of the stringency of DNA microsatellite marker genotypes for use in individual animal identification[J]. Anim Genet, 2000, 53: 345-348.
- [19] Bessert M L, Ortí G. Microsatellite loci for paternity analysis in the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Teleostei: Cyprinidae) [J]. Mol Ecol Notes, 2003, 3(4): 532-534.
- [20] Laurent E, Heidi E L, Lischer, et al. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[M]. Mol Ecol Res, 2010, 5: 564-567.
- [21] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[M]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [22] Yeh F C, Yang R C, POPGENE Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis[M]. Centre for International Forestry Research, University of Alberta and Tim Boyle, 1999.
- [23] Kohlmann K, Gross R, Murakaeva A, et al. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) popula-

- tions throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers[J]. Aquat Living Res, 2003, 16: 421–431.
- [24] Bartfai R, Egedi S, Yue G H, et al. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers[J]. Aquaculture, 2003, 1: 157–167.
- [25] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314–331.
- [26] 李思发, 王强, 陈永乐. 长江, 珠江, 黑龙江三水系的鲢, 鳙, 草鱼原种种群的生化遗传结构与变异[J]. 水产学报, 1986, 10(4): 351–372.
- [27] 张四明, 汪登强, 邓怀. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 142–147.
- [28] Wright S. Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1984.
- [29] Crawford A M, Littlejohn R P. The use of DNA markers in deciding conservation priorities in sheep and other livestock[J]. Anim Genet Res Inform, 1998, 23: 21–26.
- [30] 闫路娜, 张德兴. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响[J]. 动物学报, 2004, 50(2): 279–290.
- [31] 包文斌, 束婧婷, 许盛海, 等. 样本量和性比对微卫星分析中群体遗传多样性指标的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(1): 6–9.

Genetic analysis of grass carp populations from three major watersheds based on 26 microsatellite markers

ZHOU Pan^{1,2}, ZHANG Yan¹, XU Peng¹, LU Cuiyun³, SUN Xiaowen^{1,3}

1. The Centre for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. College of Aqua-Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian, Liaoning 116023, China;

3. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) are economically important in China, though wild populations have been in serious decline throughout the region. We used microsatellite markers to evaluate the genetic diversity amongst grass carp from four populations in three watersheds (Yangtze River, Pearl River, and Heilongjiang River). We selected 26 microsatellite markers and calculated heterozygosity, polymorphism information content (PIC), valid allele number, allele frequency, genetic distance, genetic similarity coefficient, and Hardy-Weinberg balance deflection index. There was a high degree of polymorphism within the markers in all three watersheds. The mean polymorphism information content (PIC) ranged from 0.581 3 to 0.638 6. Each microsatellite locus had 2–11 alleles (mean: 5.46). We identified a total of 154 alleles from all four populations, with a mean number of valid alleles of 3.455 6. The heterozygosity was between 0.711 4 and 0.804 5. F_{ST} and AMOVA analysis across all populations and loci suggested that there was low level of divergence amongst the four populations ($F_{ST}=0.031\ 73$). The Jianli population and the Hanjiang population were grouped in one cluster, which was clustered with the Pearl River population. The Heilongjiang population was grouped in a separated cluster. Our results suggest that there is a high level of genetic diversity among grass carp from the three watersheds, and no obvious differentiation. Our results may be used to better manage the fishery for conservation of locally adapted populations.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; microsatellite; wild population; genetic diversity

Corresponding author: SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com