

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01032

建鲤、黄河鲤杂交后代微卫星标记多态性及其与体质量的关联性

苏胜彦^{1,2}, 董在杰^{1,2,3}, 曲疆奇², 梁政远², 张建桥², 刘伟², 马良骁², 袁新华^{1,2}

1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;
3. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095

摘要: 为了解微卫星标记多样性与鲤杂交 F_1 体质量的关联性, 本研究以 2 个品种鲤(*Cyprinus carpio*)(建鲤、黄河鲤)双列杂交 F_1 的 4 个群体为实验材料, 应用 25 对微卫星引物进行遗传多样性分析, 并检测不同基因型间体质量的差异。实验结果显示, 不同组合单个位点的等位基因数为 5.08~6.08, 有效等位基因数为 1.4~6.8, 平均观测杂合度为 0.62~0.77, 平均期望观测杂合度为 0.47~0.55, 平均 PIC 为 0.42~0.49。4 个鲤群体中, 黄河鲤纯繁群体(Hh)和黄建杂交群体(Hj)间的遗传相似性系数最大(0.979 5)。基于 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 系统树显示, 黄河鲤纯繁群体(Hh)和黄建杂交群体(Hj)亲缘关系最近。采用最小二乘法分析微卫星座位与体质量的关联性发现, HLJ13 位点在纯繁组合不同基因型之间都检测到了显著性差异, Koi42 位点只在建鲤纯繁组合内检测到基因型之间的差异; 除此之外, 只有 Koi42AA 型检测到的体质量值在杂交组合 Hj 和 Jh 中显著高于亲本建鲤和黄河鲤自繁组合。以上结果提示 Koi42 位点可能与杂种优势相关, 这为下一步分子标记辅助选育奠定了基础。

关键词: 鲤; 微卫星; 多态性; 体质量; 双列杂交

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1032-11

建鲤(*Cyprinus carpio* Jian)是由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心培育, 经全国水产原种和良种审定委员会审定的水产良种, 在中国鲤养殖中占有重要地位。为了建鲤能够更快地生长, 迫切需要对建鲤进行进一步选育。而通过获得具有目标性状杂种优势的 F_1 是对鲤种质资源有效利用和挖掘的重要途径^[1-2]。因此, 淡水渔业研究中心进行了建鲤和黄河鲤的杂交选育, 实验结果表明其后代具有杂种优势。但是对 F_1 遗传资源进行评价, 尤其从分子水平研究鱼类品种的遗传多样性、遗传结构及系统发育关系, 将为建鲤和黄河鲤 F_1 遗传资源的保护和利用提供最直接的理论和实践依据。

遗传资源评价和多样性分析采用的方法主要

有限制性酶切片段长度多态性分析、扩增片段长度多态性分析、随机扩增多态 DNA 分析、单位点微卫星多态性分析、序列标记微卫星分析、DNA 单链构象多态性分析、DNA 序列测定及基因芯片分析技术。其中, 微卫星(microsatellite), 又称简单序列重复(sample sequence repeats, SSR), 一般是以 1~6 个碱基为核心序列^[3]。其因数量多、多态性好、呈共显性遗传等优点, 被广泛应用于水产动物遗传连锁图构建、亲缘关系鉴定和遗传多样性分析等领域^[4-6], 而通过微卫星分子标记来分析和评价 F_1 遗传资源更成为近年来研究的焦点, 尤其是其可用于分子标记辅助育种。El-Maghraby 等^[7]分析了配合力和微卫星多态性的关系, 基于 F_1

收稿日期: 2000-00-00; 修订日期: 2000-00-00.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目专题(2006BAD01A1208); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-46); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2009JBF01); 江苏省自然科学基金(BK2010164).

作者简介: 苏胜彦(1982-), 男, 助理研究员, 研究方向为鱼类分子数量遗传学. E-mail: susy@ffrc.cn

通信作者: 董在杰, 研究员. Tel: 0510-85558831; E-mail: dongzj@ffrc.cn

遗传资源的回交辅助选择^[8], 更有助于单交的预测^[9]。而用于鲤遗传资源的微卫星标记已有很多报道, 主要集中在 MFW 系列^[10-11]、HLJ 系列^[12-13]、Koi 系列^[14]、Cca 系列^[15]等。但是用于分析 F₁ 遗传资源的报道较少, 本研究则通过微卫星标记, 检测不同自繁和杂种鲤 (建鲤、黄河鲤纯种繁育组合及其正反交组合) 的遗传多样性及同一品种内不同生产性能个体的多态性标记, 分析微卫星标记的遗传多样性与不同鲤品种及其杂交后代生长性能之间的关系, 为生产和鱼类育种提供依据, 同时也为后期 QTL 定位奠定基础。

1 材料及方法

1.1 实验材料

建鲤、黄河鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地, 其中黄河鲤引自河南黄河鲤良种场。

1.2 实验设计

采用 2×2 完全双列杂交来分析杂交效果, 共产生 4 个组合(表 1), 每个组合 24 尾(不考虑家系)。不同组合用网箱分割配种, 在体质量为 10 g 左右时, 用 PIT 标记每尾鱼, 并在标记和起捕时测量体质量、体长、体高和体厚 4 个指标。为了尽量控制鱼的生活环境, 所有实验鱼在同一池塘养殖, 同一人投饵料。

1.3 总 DNA 提取

基因组总 DNA 的提取步骤如下: 取 30 μL 抗凝血, 加入 0.5 mL 鱼血裂解液, 放入 2 mL 离心管中。加入蛋白酶 K 至终质量浓度 200 μg/mL, 混匀, 55℃水浴消化 24~36 h, 视情况补加蛋白酶 K, 继续消化。加入等体积的 Tris 饱和酚(pH8.0), 缓慢颠倒离心管 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 用大口径的枪头小心吸取上清液至干净的离心管。加入等体积酚:氯仿(1:1), 缓慢颠倒离心管 10

min, 12 000 r/min 离心 10 min, 用大口径的枪头小心吸取上清液至干净的离心管。加入等体积氯仿, 缓慢颠倒离心管 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液至干净的离心管。加入 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 室温旋转 1 min 左右至致密的絮状 DNA 出现。用干净的枪头把 DNA 挑出放入干净的离心管, 用 70%的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次, 稍抽干后加入适量 TE(pH8.0)缓冲液, 置 37℃恒温箱内 12 h, 溶解 DNA。待 DNA 完全溶解后用分光光度计检测浓度和纯度。将溶解后的 DNA 置于-20℃保存。

1.4 微卫星引物和 PCR 扩增

微卫星标记选择参照 Chen 等^[16], David 等^[14]和魏东旺等^[12]的文献, 标记选择的原则是等位基因数多并具有高度多态性。微卫星引物由 Invitrogen 公司合成。

PCR 反应体系为 25 μL, 包括 10×buffer 15 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 1 μL, dNTPs (2 mmol/L) 各 1 μL, 上下游引物(10 mmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, Taq DNA 聚合酶 1 U, dd H₂O 扩增反应均在 TAKARA 公司梯度 PCR 仪上完成, PCR 反应程序为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 20 s, 退火温度 48~58℃ 20 s, 72℃延伸 30 s, 28 个循环; 72℃延伸 10 min。将反应后的 PCR 产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合 goldview 显色进行检测, UVP 扫描仪扫描成像, 分析每个个体基因型。

1.5 数据分析

根据所得到的基因型数据, 利用 Popgene (Version3.2) 软件统计微卫星基因座的观察等位基因数(*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*)、Shannon 指数^[3], 哈迪-温伯格平衡(HDE)和连锁不平衡检测(LD)由在线软件 Genepop (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op2。

表 1 2×2 完全双列杂交产生的 F₁ 组合
Tab.1 F₁ combinations generated by 2×2 full diallel cross

黄河鲤 Huanghe carp(h, ♀)		建鲤 Jian carp(j, ♀)
黄河鲤 Huanghe carp(H, ♂)	黄河纯繁 Hh	黄建 Hj
建鲤 Jian carp(J, ♂)	建黄 Jh	建鲤纯繁 Jj

html) 计算。多态信息含量(PIC)由软件 PIC_CALC 计算^[17], 聚类图由 Mega4.1 作图^[18]。通过 SAS 8.0 GLM 过程分析不同基因型之间体质量的差别^[19]。

2 结果与分析

2.1 不同亲本组合子代微卫星分析结果

2.1.1 遗传多样性 根据 25 对引物的微卫星扩增结果, 对鲤各群体的遗传多样性进行了分析(表 2、表 3)。在 4 个鲤群体中检测的等位基因数(N_a)为 5.08~6.08, 有效等位基因数(N_e)为 2.04~2.39, Shannon 指数为 0.94~1.07。25 个微卫星标记在各群体中检测到的平均观测杂合度为 0.62~0.77, 期望观测杂合度为 0.47~0.55, 多态信息含量为 0.42~0.49。

不同组合的遗传相似性系数和遗传距离见表 4。4 个鲤群体中, 黄河鲤和黄建杂交(Hj)群体间的遗传相似性系数最大(0.979 5), 遗传距离为 0.02; 建鲤和黄建杂交(Hj)群体间的遗传相似性系数次之(0.924 2), 遗传距离为 0.088; 黄河鲤和建黄杂交(Jh)群体间的遗传相似性系数最小(0.919 3), 遗传距离为 0.08。

2.1.2 聚类分析 根据遗传距离, 对 25 个微卫星标记的 4 个组合进行 UPGMA 聚类, 结果见图 1。从图 1 中可以看出, 黄河鲤和黄建杂交鲤(Hj)群体先聚为一类, 其次是建鲤和建黄杂交鲤(Jh)群体聚为一类, 最后 4 个群体聚在一起。这说明 4 个鲤群体之间在基因水平上存在一定程度的歧化。

2.2 哈迪-温伯格平衡和连锁不平衡检测

哈迪-温伯格平衡检测发现, 4 个组合的绝大多数微卫星位点都遵循哈迪-温伯格平衡定律; 对于不平衡的位点, 分别针对不区分组合和区分组合 2 种情况进行平衡检测, 具体结果见附录 1 和附录 2。检测结果发现, 不区分组合的不平衡位点有 10 个, 在建鲤纯繁(Hh)和建黄(Jh)组合中较多。连锁不平衡分组合内和不区分组合的座位配对(附录 3 和附录 4), 检测结果显示, 不区分组合的连锁不平衡配对有 27 对, 其中不同基因家族的微卫星座位之间存在连锁不平衡的概率较大。

2.3 微卫星位点与体质量的关联分析

采用最小二乘法分析微卫星座位与体质量的关联性, 结果显示, 将所有个体作为分析对象, 在 *Koi42* 和 *HLJ13* 这 2 个座位分型之间检测到了显著性差异。*Koi42* 座位 AB 基因型的体质量值较大, *HLJ13* 座位 AA 基因型的体质量值较大(表 5)。

HLJ13 位点在纯种繁育组合不同基因型之间都检测到了显著性差异($P<0.05$), 而 *Koi42* 位点只在建鲤纯种繁育组合内检测到基因型之间的差异(表 6)。这 2 个基因座位同一种基因型在不同组合内与体质量的关联性分析见表 7。只有 *Koi42* 位点 AA 型检测到的体质量值在黄建(Hj)和建黄(Jh)杂交组合中显著高于亲本建鲤(Jj)和黄河鲤(Hh)自繁组合 ($P<0.05$)。

3 讨论

对于不同来源的群体、不同品种杂交后代微卫星多样性分析已有很多报道^[21-22]。本研究中不同组合单个位点的等位基因数为 5.08~6.08 个, 有效等位基因数为 1.4~6.8 个。而杂交组合中等位基因数和有效等位基因数与纯繁组合没有显著差异, 这与傅建军等^[23]的报道不一致, 这可能与所选的微卫星序列有关。但也说明这 25 对微卫星的传递性比较好, 可用于微卫星育种。在本实验中, 在 *HLJ13* 和 *Koi42* 座位上, 不同基因型之间均检测到了体质量的差异, 如果其能够在 F_2 、回交 F_1 中传递, 则可以实现这些座位的辅助育种^[24]。本研究还发现有效等位基因数低于观察等位基因数, 这说明等位基因在群体中的分布还不够均匀。可能在鲤长期选育过程中, 某些位点受到了较大的选择压力, 从而造成了某些基因座位上等位基因分布不均匀, 故应适当增加样本数或检测的基因位点数^[25]。

本研究所检测 4 个组合的 PIC 值均为中度多态 ($0.25<PIC<0.5$); 平均观测杂合度为 0.62~0.77, 期望观测杂合度为 0.47~0.55, 这说明这 25 对微卫星引物在这 4 个组合中所提供的多态信息含量较为丰富, 用其进行遗传多样性分析具有较

表 2 25 对微卫星引物对 4 个鲤 F₁ 组合的遗传变异分析Tab. 2 Genetic variation on all the 25 polymorphic loci in four common carp F₁ combinations

座位 locus	F ₁ 组合 F ₁ combination											
	Hh			Hj			Jh			Jj		
	观察等位基 数 N_a	有效等位基 因数 N_e	Shannon 指数 I	观察等位基 因数 N_a	有效等位基 因数 N_e	Shannon 指数 I	观察等位基 因数 N_a	有效等位基 因数 N_e	Shannon 指数 I	观察等位基 因数 N_a	有效等位基 因数 N_e	Shannon 指数 I
<i>CCE13</i>	14	2.9767	1.7465	10	3.0557	1.6007	12	3.5623	1.8147	8	3.5776	1.6268
<i>CCE19</i>	4	1.5505	0.7083	6	1.9041	1.0230	3	1.7536	0.7595	3	1.1941	0.3557
<i>CCE23</i>	13	3.0667	1.6949	15	3.6688	1.9498	11	3.9552	1.8173	11	3.7403	1.7229
<i>CCE25</i>	4	1.5365	0.6983	8	2.8636	1.4470	5	2.6667	1.1917	8	3.3283	1.5573
<i>CCE41</i>	7	2.3320	1.2327	12	3.5033	1.7747	10	3.3295	1.6353	9	3.1582	1.5568
<i>CCE43</i>	4	1.4355	0.6186	4	1.3242	0.5166	7	2.9333	1.3466	11	3.4632	1.7359
<i>CCE48</i>	13	3.3029	1.8177	14	3.6119	1.8921	6	2.9512	1.3511	6	2.4200	1.2416
<i>CCE55</i>	2	1.0425	0.1013	4	1.7978	0.8618	5	2.9712	1.3335	2	1.4032	0.4620
<i>CCE65</i>	4	2.1753	1.0133	4	2.0076	0.8906	3	2.6253	1.0278	4	2.2655	0.9283
<i>CCE76</i>	3	1.7147	0.6720	3	1.5513	0.6324	3	1.9168	0.8370	3	1.5238	0.6160
<i>CCE89</i>	3	1.3170	0.4597	3	1.4049	0.5443	3	1.2915	0.4563	3	1.3505	0.5150
<i>Koi29</i>	4	1.8400	0.8141	4	1.7126	0.7740	3	2.0868	0.7826	3	1.3170	0.4597
<i>Koi33</i>	2	1.0425	0.1013	3	1.2347	0.3863	4	1.3722	0.5719	6	2.3179	1.1858
<i>Koi37</i>	9	2.3960	1.3088	11	2.9333	1.5662	11	3.4588	1.7240	10	2.8639	1.4949
<i>Koi39</i>	9	2.5013	1.4229	12	3.3195	1.7740	4	2.1753	1.0133	4	2.5071	1.0389
<i>Koi42</i>	3	2.4253	0.9673	3	1.6661	0.7088	3	1.8726	0.8129	3	2.4615	0.9743
<i>Koi45</i>	3	2.0817	0.8813	4	2.4378	1.0965	6	2.4261	1.1781	5	2.2655	1.1218
<i>Koi46</i>	4	1.9760	0.9602	6	2.0584	1.0756	4	2.3511	1.0844	4	2.3669	1.0319
<i>Koi108</i>	4	2.4563	1.0495	3	1.7120	0.7400	3	1.5697	0.6699	3	1.5673	0.6081
<i>HLJ02</i>	3	1.7660	0.6969	2	1.7817	0.6306	2	1.7817	0.6306	2	1.8000	0.6365
<i>HLJ10</i>	3	1.9702	0.7533	3	1.9557	0.7536	3	2.1818	0.8877	3	2.2558	0.9377
<i>HLJ13</i>	4	1.6831	0.7745	5	2.8138	1.2098	3	2.0997	0.7924	3	2.6650	1.0392
<i>HLJ44</i>	7	2.5208	1.2735	6	2.9197	1.3106	5	2.5745	1.1359	6	2.7191	1.2602
<i>HLJ46</i>	3	1.2872	0.4331	2	1.2654	0.3650	3	1.4383	0.5426	4	2.3595	1.0828
<i>HLJ48</i>	6	2.6018	1.2010	5	3.0418	1.3052	5	2.3158	1.1114	6	2.3669	1.1490
平均值 mean	5.4±3.53	2.04±0.62	0.94±0.45	6.08±3.93	2.30±0.80	1.07±0.49	5.08±2.91	2.39±0.72	1.06±0.40	5.2±2.80	2.37±0.73	1.05±0.42

Note : N_a means observed number of alleles. N_e means effective number of alleles. I means Shannon's information index.

表 3 25 对微卫星标记对 4 个鲤 F₁ 组合的杂合度分析
 Tab. 3 Heterozygosity for all the 25 polymorphic loci in four common carp F₁ combinations

座位 locus	F ₁ 组合 F ₁ combination											
	Hh			Hj			Jh			Jj		
	观察杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	多态信息含 量 PIC	观察杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	多态信息含 量 PIC	观察杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	多态信息含 量 PIC	观察杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	多态信息含 量 PIC
CCE13	0.8750	0.6782	0.65	0.9167	0.6871	0.65	1	0.7353	0.70	0.9583	0.7358	0.70
CCE19	0.4167	0.3626	0.33	0.5833	0.4849	0.45	0.5455	0.4397	0.39	0.1739	0.1662	0.16
CCE23	0.9130	0.6889	0.65	1	0.7429	0.72	0.9524	0.7654	0.73	1	0.7482	0.70
CCE25	0.4091	0.3573	0.33	0.9048	0.6667	0.62	0.9091	0.6395	0.58	1	0.7166	0.67
CCE41	0.7500	0.5833	0.54	1	0.7304	0.70	1	0.7145	0.67	0.9565	0.6986	0.66
CCE43	0.3478	0.3101	0.28	0.2727	0.2505	0.23	1	0.6744	0.61	1	0.7295	0.69
CCE48	0.9412	0.7184	0.68	1	0.7400	0.71	0.7727	0.6765	0.62	0.7727	0.6004	0.56
CCE55	0.0417	0.0417	0.04	0.5500	0.4551	0.41	0.9474	0.6814	0.63	0.3478	0.2937	0.25
CCE65	0.7273	0.5529	0.49	0.6957	0.5130	0.44	1	0.6329	0.55	1	0.5710	0.46
CCE76	0.5652	0.4261	0.35	0.4348	0.3633	0.32	0.6250	0.4885	0.43	0.4167	0.3511	0.31
CCE89	0.2727	0.2463	0.22	0.3333	0.2943	0.26	0.2500	0.2305	0.21	0.2917	0.2651	0.24
Koi29	0.6087	0.4667	0.40	0.5238	0.4262	0.37	1	0.5324	0.40	0.2727	0.2463	0.22
Koi33	0.0417	0.0417	0.04	0.2083	0.1941	0.18	0.3043	0.2773	0.26	0.7500	0.5807	0.54
Koi37	0.7727	0.5962	0.55	0.9091	0.6744	0.63	1	0.7282	0.69	0.9091	0.6660	0.62
Koi39	0.7727	0.6142	0.58	0.9500	0.7167	0.68	0.7273	0.5529	0.49	1	0.6145	0.52
Koi42	0.9583	0.6002	0.51	0.5000	0.4091	0.36	0.6087	0.4763	0.42	1	0.6064	0.51
Koi45	0.7273	0.5317	0.46	0.8261	0.6029	0.54	0.8182	0.6015	0.54	0.7391	0.5710	0.52
Koi46	0.6250	0.5044	0.46	0.6522	0.5256	0.48	0.7826	0.5874	0.53	0.8261	0.5903	0.52
Koi108	0.8750	0.6055	0.53	0.5217	0.4251	0.37	0.4348	0.3710	0.33	0.4583	0.3697	0.31
HLJ02	0.6000	0.4449	0.36	0.6500	0.4500	0.34	0.6500	0.4500	0.34	0.6667	0.4553	0.35
HLJ10	0.7826	0.5034	0.39	0.7619	0.5006	0.39	0.8333	0.5532	0.46	0.8095	0.5703	0.49
HLJ13	0.5000	0.4175	0.37	1	0.6589	0.59	1	0.5372	0.41	1	0.6386	0.55
HLJ44	0.8182	0.6173	0.57	1	0.6744	0.61	1	0.6258	0.54	0.9091	0.6469	0.59
HLJ46	0.2500	0.2278	0.21	0.2381	0.2149	0.18	0.3636	0.3118	0.27	0.7895	0.5917	0.53
HL J48	0.9048	0.6307	0.56	1	0.6885	0.63	0.7727	0.5814	0.53	0.8000	0.5923	0.53
平均值 mean	0.62±0.27	0.47±0.19	0.42	0.70±0.27	0.52±0.17	0.47	0.77±0.24	0.55±0.15	0.49	0.75±0.27	0.54±0.17	0.49

Note: N_O means observed heterozygosity. N_E means expected heterozygosity. I means polymorphism information content.

表 4 4 个鲤群体间的遗传相似性系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Tab.4 Inter-population Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) between four common carp populations

群体 population	Hh	Hj	Jh	Jj
Hh		0.9795	0.9193	0.9229
Hj	0.0207		0.9234	0.9242
Jh	0.0842	0.0797		0.9241
Jj	0.0803	0.0788	0.0789	

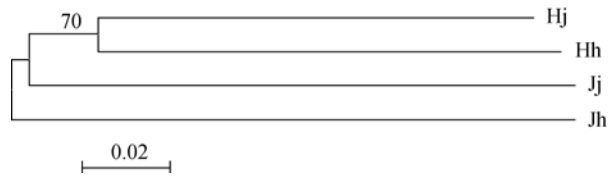


图 1 4 个鲤群体间的 UPGMA 聚类关系树

Fig.1 UPGMA dendrogram of four common carp populations

表 5 微卫星标记对体质量分型的多重比较

Tab. 5 Different genotypes for body weight based on polymorphic loci

座位 locus	基因型 genotype	体质量的最小二乘估计值 LS mean of body weight
Koi42	AA	264.33±21.75 ^{ab}
	AB	283.42±10.88 ^a
	AC	234.06±8.88 ^b
HLJ13	AA	309.75±21.41 ^a
	AB	242.85±8.17 ^b
	AC	245.39±10.83 ^b

注: 同一座位下标注不同字母的各项间差异显著($P<0.05$).
Note: on the same locus, different letters donate significant difference($P<0.05$).

高的有效性和可靠性。杂种 F_1 与作为 F_1 亲本的纯繁组合相比, 杂合度和期望杂合度较高, 这与傅建军等^[23]的结果一致。说明杂交能够提高作为亲本品种的遗传结构变异, 从而为品种选育提供基础。

卡方检验哈迪-温伯格平衡结果表明, 10 对微卫星位点显著偏离了哈迪-温伯格平衡, 说明群体内的基因型频率发生了较大改变, 尤其是建鲤纯繁(Jj)和建黄杂交(Jh)组合中较多, 这主要与高强度的人工选择有关。连锁不平衡分析表明, 绝大多数配对连锁平衡, 在不区分组合时, 连锁不平衡配对有 27 对, 这说明这些标记位点对鲤分子标

表 6 组内微卫星标记对体质量分型的多重比较
Tab. 6 Comparison of genotypes for body weight based on polymorphic locus within groups

位点 locus	F_1 组合 F_1 combination	基因型 genotype	体质量的最小二乘估计值 LS means of body weight
HLJ13	Hh	AB	167.17±14.31 ^a
		AC	212.83±14.31 ^b
		AB	284.33±20.34
	Hj	AB	268.94±11.68
		AC	276.25±24.78
		AB	266.37±11.37
	Jh	AC	212.00±49.56
		AA	343.25±24.78
		AB	254.67±11.68 ^b
Koi42	Jj	AB	354.8±21.61 ^a
		AC	245.26±11.09 ^b

注: 同一座位下标注不同字母的各项间差异显著($P<0.05$).
Note: on the same locus, different letters donate significant difference($P<0.05$).

表 7 组间微卫星标记对体质量分型的多重比较

Tab. 7 Comparison of genotypes for body weight based on polymorphic loci between different groups

座位 locus	F_1 组合 F_1 combination	基因型 genotype	体质量的最小二乘估计值 LS means of body weight
HLJ13	Jh	AA	276.25±24.78 ^b
		AA	343.25±24.78 ^{a*}
		AB	167.17±14.31 ^b
	Hj	AB	284.33±20.34 ^a
		AB	266.37±11.37 ^a
		AB	254.67±11.68 ^a
	Hh	AC	212.83±14.31 ^b
		AC	268.94±11.68 ^a
		AC	212.00±49.56 ^b
Koi42	Hh	AA	129±48.33 ^b
		AA	282.17±13.95 ^a
		AA	278.78±16.11 ^a
	Hj	AB	204.33±19.73 ^c
		AB	301.5±34.17 ^{ab}
		AB	268.5±17.09 ^b
	Jh	AB	354.8±21.61 ^a
		AC	188.53±11.72 ^b
		AC	259.75±17.09 ^b
	Jj	AC	251.5±19.73 ^b
		AC	245.26±11.09 ^a

注: 同一座位下标注不同字母的各项间差异显著($P<0.05$).
Note: on the same locus, different letters donate significant difference($P<0.05$).

记辅助选择有一定的应用价值^[26]。

研究发现,同一基因型在不同组合间体质量有显著差异,比如 *Koi42* 和 *HLJ13* 座位 AA 基因型与 H_j 和 J_h 杂交组合的杂种优势有关,如果在 F₂ 或回交组合中还能检测到这种基因型,说明这个位点可能用于标记辅助选择。另外体质量在不同组同一基因型之间也检测到了差异,比如在 H_j 里检测到,但是在 J_h 中没有检测到,这说明该基因位点可能与正反交有关;也有在杂交组合中体质量值较低,这也可能与杂交抑制有关^[27]。这些都说明微卫星的多态性,将为下一步育种提供条件。

Scribne 等^[28]认为亲缘关系近的群体有较大的遗传相似性。本研究 4 个鲤群体中,黄河鲤和黄建杂交(H_j)群体间的遗传相似性系数最大(0.979 5),黄河鲤和建黄杂交(J_h)间的遗传相似性系数最小(0.919 3),这说明正、反交群体与父本(或是母本)的遗传相似性有差别。Nei^[29]和 Takahashi 等^[30]通过计算机模拟对各种遗传距离进行研究,证明在分析物种内群体间的遗传变异时,计算 Nei's 遗传距离(DA)和 Nei's 标准距离(DS)是获得准确系统发生树的最有效方法,且用 UPGMA 法优于 NJ 法。本实验计算了 DA,并根据该遗传距离进行 UPGMA 聚类分析。结果表明,杂交 F₁ 与父本先聚为一类,最后再聚到一起。这说明遗传距离的不同引起了聚类结果的差异,杂交 F₁ 在遗传距离上有亲本倾向性。本研究的杂交后代具有倾向父本的趋势。

遗传距离还可用于配合力的分析,研究显示配合力与微卫星多态性有关^[7],并已证明微卫星多态性可用于特殊配合力的预测。根据 El-Maghraby 等^[7]的研究,结合本实验获得的 Nei's 遗传距离数据,推测建鲤为最好的配种亲本,建黄为最佳的杂交组合,但是要证明建鲤一般配合力较高,至少还需要 3×3 完全双列杂交实验的微卫星分析结果。

参考文献:

[1] Bakes J, Gorda S. Genetic improvement of common carp

strains using intraspecific hybridization [J]. Aquaculture, 1995, 129: 183–186.

[2] Linhart O, Gela D, Rodina M, et al. Top-crossing with paternal inheritance testing of common carp (*Cyprinus carpio* L.) progeny under two altitude conditions [J]. Aquaculture, 2002, 204: 481–491.

[3] 张义凤, 张研, 鲁翠云, 等. 鲤鱼微卫星标记与体质量、体长和体高性状的相关分析[J]. 遗传, 2008, 30(5): 613–619.

[4] Lee B Y, Lee W Y, Streelman J T, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. Genetics, 2005, 170(1): 237–244.

[5] Aggarwal R A K, Dixit S P, Verma N K, et al. Population genetics analysis of Mehsana goat based on microsatellite markers[J]. Curr Sci, 2007, 92(8): 1133–1137.

[6] 李莉好, 喻达辉, 黄桂菊. 尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及其正、反杂交群体的遗传多样性[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 585–592.

[7] El-Maghraby M A, Moussa M E, Hana N S, et al. Combining ability under drought stress relative to SSR diversity in common wheat[J]. Euphytica, 2005, 141: 301–308.

[8] Lasry Benchimol L L, de Souza Jr C L, de Souza A P. Microsatellite-assisted backcross selection in maize[J]. Genet Mol Biol, 2005, 28: 789–797.

[9] Balestre M, Von Pinho R G, Souza J C. Prediction of maize single-cross performance by mixed linear models with microsatellite marker information[J]. Genet Mol Res, 2010, 9 (2): 1054–1068.

[10] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Anim Genet, 1997, 28:129–134.

[11] 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]. Anim Genet, 2004, 40(10): 1144–1148.

[12] Wei D W, Lou Y D, Sun X W, et al. Isolation of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Zool Res, 2001, 22(3): 238–241.

[13] 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[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 126–132.

[14] David L, Rajasekaran P, Fang J, et al. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers [J]. Mol Gen Genet, 2001, 266: 353–362.

[15] Yue G H, Ho M Y, Orban L, et al. Microsatellites with in

- genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp [J]. *Aquaculture*, 2004, 234: 85–98.
- [16] Cheng L, Liu L, Yu X, et al. A linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*) based on AFLP and microsatellite markers [J]. *Anim Genet*, 2010, 41(2): 191–198.
- [17] 梅秋兰, 刘臻, 张学文, 等. 鳊原种群和养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(2): 266–272.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Bio Evol*, 2007, 24: 1596–1599.
- [19] Badri M, Zitoun A, Ilahi H, et al. Morphological and microsatellite diversity associated with ecological factors in natural populations of *Medicago laciniata* Mill. (Fabaceae) [J]. *J Genet*, 2008, 87: 241–255.
- [20] Li D, Kang D, Yin Q, et al. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations [J]. *J Genet Genom*, 2007, 34(11): 984–993.
- [21] Rakus K, Imazarowa I, Forlenza M, et al. Classical crosses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show co-segregation of antibody response with major histocompatibility class II B genes[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26: 352–358.
- [22] Wang J, Xia D. Studies on fish heterosis with DNA fingerprinting [J]. *Aquac Res*, 2002, 33: 941–947.
- [23] 傅建军, 王荣泉, 刘峰, 等. 草鱼长江和珠江群体及长江×珠江杂交组合遗传差异的微卫星分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(4): 433–439.
- [24] Benchimol B L, de Souza Jr C L, de Souza A P. Microsatellite-assisted backcross selection in maize[J]. *Genet Mol Biol*, 2005, 28: 789–797.
- [25] 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.
- [26] 李延璐, 储明星, 陈宏权, 等. 绵羊微卫星 BMS2508 和 FecB 基因的多态及连锁分析[J]. *遗传*, 2009, 31(5): 500–507.
- [27] McClelland E K, Naish K A. What is the fitness outcome of crossing unrelated fish populations? A meta-analysis and an evaluation of future research directions[J]. *Conserv Genet*, 2007, 8: 397–416.
- [28] Scribner K T, Evans J E, Morreale S J, et al. Genetic divergence among populations of the yellow-bellied slider turtle (*Pseudemys scripta*) separated by aquatic and terrestrial habitats [J]. *Copeia*, 1986: 691–700.
- [29] Nei M. *Molecular Evolutionary genetics*[M]. New York: Colombia University Press, 1987: 512.
- [30] Takahashi H, Nirasawa K, Nagamine Y, et al. Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms [J]. *J Hered*, 1998, 89(6): 543–546.

Microsatellite-based genetic diversity of 2×2 full diallel cross of Jian carp and Huanghe carp and related bodyweight correlation

SU Shengyan^{1,2}, DONG Zaijie^{1,2,3}, QU Jiangqi², LIANG Zhengyuan², ZHANG Jianqiao², LIU Wei², MA Liangxiao², YUAN Xinhua^{1,2}

1. Key Open Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. College of Fishery, Nanjing Agricultural University, Nanjing 214081, China;
3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the relationship between diversity of microsatellite loci with common carp cross F₁. 25 microsatellite loci were used to analyze the genetic diversity of 2×2 full diallel cross of common carp (*Cyprinus carpio*) population and body weight variation among different genotypes. The result showed that the number of alleles ranged from 5.08 to 6.08. Effective numbers of alleles ranged from 1.4 to 6.8, PIC were from 0.42 to 0.49. The average expected heterozygosity value was ranged from 0.47 to 0.55. The highest genetic similarity index that came from the populations of Hh and Hj was 0.9795. The UPG MA trees

based on genetic distance demonstrated that Huanghe carp was genetically near to Huanghe carp ♂×Jian carp ♀. The association between these microsatellite loci and body weight was analyzed by least square linear model. The results showed that significant differences were detected between different genotypes of purebred carps on the HLJ13 locus. Compared to this, this difference was only found in Jian purebred group of Koi42. AA genotype of Koi42 was the most favorable one, while the Hj and JH combinations had higher body weight than that of their parents' pure breeds. The study provis the foundation for molecular assistant selection of common carp in the future.

Key words: *Cyprinus carpio*; microsatellite; body weight; diallel cross

Corresponding author: DONG Zaijie. Tel: 0510-85558831; E-mail: dongzj@ffrc.cn

附录 1 不区分组合的哈迪-温伯格平衡检测结果

Appendix 1 Hardy-Weinberg equilibrium test by locus

座位 locus	组合 combination	P	座位 locus	组合 combination	P
CCE25	Jj	0.0251	HLJ10	Hh	0.0065
CCE43	Jj	0.0021	HLJ10	Hj	0.0148
CCE65	Jj	<0.001	HLJ10	Jj	0.0053
CCE65	Jh	<0.001	HLJ10	Jh	0.0283
Koi29	Jj	<0.001	HLJ13	Hj	<0.001
Koi39	Jh	<0.001	HLJ13	Jj	<0.001
Koi42	Jh	<0.001	HLJ13	Jh	<0.001
HLJ02	Jh	0.0498	HLJ44	Jh	0.0022
HLJ48"	Hj	0.0016	HLJ44	Hj	<0.001

附录 2 不同组合内哈迪-温伯格平衡检测结果

Appendix 2 Hardy-Weinberg equilibrium test by combination

组合 combination	座位 locus	P	组合 combination	座位 locus	P
Hh	Koi42	<0.001	Hj	HLJ10	0.0148
	Koi108	0.0054		HLJ13	<0.001
	HLJ10	0.0065		HLJ44	0.0022
Jj	CCE25	0.0251	Jh	HLJ48	0.0016
	CCE43	0.0021		CCE65	<0.001
	CCE65	<0.001		Koi39	<0.001
	Koi29	<0.001		Koi42	<0.001
	HLJ10	0.0053		Koi46	0.0317
	HLJ13	<0.001		HLJ02	0.0498
	HLJ44	<0.001		HLJ10	0.0283
				HLJ13	<0.001

附录 3 不同组合内检测到的连锁不平衡配对

Appendix 3 Genotypic linkage disequilibrium in different combinations

组合 combination	配对 locus pair	P	组合 combination	配对 locus pair	P
Hh	Koi42/Koi108	0.00014	Hj	Koi42/Koi108	0.00005
	CCE25/HLJ46	0.00091		CCE55/Koi108	0.00022
	Koi46/HLJ46	0.0035		CCE65/CCE89	0.00511
	Koi45/Koi46	0.00506		Koi108/HLJ44	0.00585
	Koi42/HLJ13	0.00669		CCE65/Koi46	0.00987
	Koi108/HLJ13	0.00938		CCE43/Koi46	0.01113
	CCE76/HLJ02	0.00989		CCE19/Koi45	0.01281
	Koi29/HLJ13	0.01335		Koi37/HLJ13	0.01297
	Koi46/HLJ02	0.01693		CCE55/Koi42	0.01508
	Koi46/HLJ13	0.01876		CCE23/CCE43	0.02015
	CCE19/HLJ02	0.02388		CCE48/Koi42	0.02309
	Koi108/HLJ48	0.02516		Koi33/Koi46	0.02479
	Koi29/Koi46	0.02593		CCE48/Koi108	0.03372
	HLJ02/HLJ10	0.02844		CCE25/CCE48	0.03886
	HLJ02/HLJ46	0.02882		Koi29/HLJ48	0.04255
	CCE19/Koi46	0.02887		CCE76/Koi33	0.04295
	CCE13/CCE48	0.02938		CCE43/HLJ48	0.04295
	CCE19/HLJ46	0.03163		CCE19/HLJ02	0.04431
	Koi37/HLJ46	0.03241		CCE55/Koi39	0.04694
	CCE89/HLJ46	0.03996		CCE23/Koi42	0.04762
	CCE55/HLJ46	0.04157		CCE25/HLJ46	0.04849
	CCE55/Koi33	0.04171	Jh	Koi39/HLJ44	0.00059
	CCE76/HLJ46	0.04306		Koi39/HLJ46	0.00151
	CCE55/HLJ10	0.0432		Koi45/HLJ44	0.00191
	Koi33/HLJ10	0.0432		CCE48/HLJ10	0.00231
	Koi33/HLJ46	0.0432		CCE13/CCE89	0.01003
	CCE55/CCE76	0.04395		CCE76/HLJ10	0.01491
	CCE55/CCE89	0.04441		Koi45/HLJ10	0.01603
	CCE89/Koi33	0.04468		CCE13/CCE48	0.0162
	CCE76/Koi33	0.04502		HLJ02/HLJ13	0.01688
	CCE13/Koi29	0.04662		CCE76/CCE89	0.01756
	CCE19/Koi37	0.0481		CCE43/HLJ48	0.02039
	CCE13/CCE43	0.04891		HLJ10/HLJ48	0.02764
Jj	Koi42/Koi108	0.00002		CCE43/HLJ46	0.02799
	CCE55/Koi45	0.00034		CCE41/CCE89	0.03176
	CCE55/Koi39	0.00072		Koi37/HLJ46	0.0335
	Koi45/HLJ10	0.00348		HLJ13/HLJ44	0.03728
	CCE25/CCE43	0.00361		CCE65/Koi42	0.03833
	CCE25/CCE55	0.00541		CCE76/HLJ48	0.04122
	CCE65/CCE89	0.00826		CCE89/Koi39	0.04431
	CCE48/Koi45	0.00871		CCE41/CCE65	0.04455
	HLJ02/HLJ46	0.00992		CCE89/HLJ48	0.04482
	CCE13/CCE55	0.01246		CCE55/Koi39	0.04647

续附表 3

App.3 continued

组合 combination	配对 locus pairs	<i>P</i>	组合 combination	配对 locus pairs	<i>P</i>
Jj	<i>CCE55/HLJ10</i>	0.02044	<i>CCE23/CCE65</i>	0.02957	0.04989
	<i>CCE55/HLJ44</i>	0.02061	<i>CCE43/Koi46</i>	0.03139	
	<i>CCE13/Koi39</i>	0.02453	<i>Koi46/HLJ44</i>	0.04123	
	<i>Koi45/HLJ44</i>	0.02476	<i>CCE23/Koi37</i>	0.04246	
	<i>CCE41/Koi108</i>	0.02487	<i>Koi29/HLJ13</i>	0.04852	
	<i>Koi45/HLJ48</i>	0.02527			
	<i>CCE43/CCE55</i>	0.02583			

附录 4 不区分组合检测到的连锁不平衡配对

Appendix 4 Genotypic linkage disequilibrium for different loci

配对 locus pair	<i>P</i>	配对 locus pair	<i>P</i>	配对 locus pair	<i>P</i>
<i>Koi42/Koi108</i>	<0.001	<i>Koi37/HLJ46</i>	0.021915	<i>CCE55/Koi108</i>	0.005873
<i>CCE55/Koi39</i>	0.000316	<i>CCE19/Koi45</i>	0.022582	<i>Koi45/HLJ10</i>	0.008196
<i>Koi45/HLJ44</i>	0.001306	<i>HLJ02/HLJ46</i>	0.022904	<i>Koi45/Koi46</i>	0.013725
<i>CCE25/HLJ46</i>	0.001633	<i>CCE55/Koi45</i>	0.023366	<i>CCE25/CCE55</i>	0.014661
<i>Koi39/HLJ46</i>	0.004078	<i>Koi46/HLJ46</i>	0.02489	<i>CCE76/Koi33</i>	0.016449
<i>Koi39/HLJ44</i>	0.005418	<i>CCE76/CCE89</i>	0.025443	<i>CCE13/CCE48</i>	0.020737
<i>CCE65/CCE89</i>	0.005567	<i>CCE43/Koi46</i>	0.026476	<i>CCE65/Koi42</i>	0.027449
<i>CCE19/HLJ02</i>	0.04199	<i>CCE76/HLJ48</i>	0.036394	<i>CCE76/HLJ10</i>	0.032703
<i>CCE55/HLJ10</i>	0.042124	<i>CCE23/CCE43</i>	0.036642	<i>CCE19/CCE76</i>	0.032847