

微卫星分子标记辅助镜鲤家系构建

鲁翠云, 曹顶臣, 孙效文, 梁利群

(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: 用微卫星标记辅助进行镜鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 家系的建立及选育, 通过对亲本遗传结构及遗传差异的分析, 预测产生优良家系的最佳配组。用 28 个微卫星分子标记评估松浦镜鲤亲本群体的遗传潜力, 结果显示, 群体的多态信息含量 (PIC) 达到 0.562 7, 处于高度的遗传多样性水平, 具备进一步繁育筛选优良群体的潜质。用 χ^2 检验和遗传偏离指数 (d) 估计 Hardy-Weinberg 平衡, 结果表明群体处于平衡状态, 但在 16 个位点表现出杂合子缺失, 这可能跟长期的人工选择有关。依据个体间的遗传距离, 连续 2 年共建立 1 对 1 亲本的繁育家系 70 个, 用网箱分别养殖, 2 月龄家系体长均值为 7.24~10.60 cm, 体质量均值为 14.02~40.63 g, 方差分析显示家系间体长、体质量差异均极显著; 对其中 4 个家系 1 龄鱼种生长情况及遗传结构分析也表明家系间的遗传分化较大, 近交系数 (F_{IS}) 达到 0.1537, 家系的多态信息含量在 0.305 6~0.407 7 之间, 保持中度多态水平。由于子代家系的生长和遗传结构两方面的实验结果证实了微卫星在辅助家系建立尤其是亲本选配方面具有较好的预测性, 所获得的家系差异较大, 具备进一步选育优良家系的潜力, 从而证实了用此方法对现有镜鲤种质进行遗传改良是可行的。[中国水产科学, 2008, 15(6): 893-901]

关键词: 微卫星; 镜鲤; 家系选育

中图分类号: S968

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)06-0893-09

鲤是中国境内分布范围最广的重要淡水经济鱼类之一, 养殖产量在水产养殖业中占相当大的比重。德国镜鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 于 20 世纪 80 年代引入中国大陆, 经过中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 20 多年的系统选育, 培育出抗寒、抗病, 适于中国大部分地区养殖的德国镜鲤选育系。但随着养殖面的扩大, 传统人工选育技术的盲目性直接导致了良种的遗传多样性水平降低、发病率增加、性成熟个体变小等近交衰退现象的出现。因此, 对良种养殖繁育群体的遗传结构研究, 进一步筛选具有育种优势的优良镜鲤品系, 将有利于抑制养殖群体的遗传退化, 有利于优异种质资源的开发、利用与保护。

微卫星 (Microsatellite) 作为近年来发展迅速、应用广泛的分子标记之一, 由于其保守性好、呈共显性遗传的特点, 在辅助育种操作中具有其他标记不可比拟的优势。微卫星标记辅助选育在作物^[1-2]及畜禽^[3-4]的研究较多, 而多数水产动物受限于微卫

星标记量的不足, 现阶段的研究多集中在对野生群体及养殖群体的遗传评估, 在选育方面开展的应用研究较少。全迎春等^[5]用 30 个微卫星分子标记揭示了 5 个镜鲤养殖群体的高度遗传多样性水平; 侯宁等^[6]对 3 个镜鲤繁殖群体的遗传潜力进行了评估, 表明繁殖群体处于中度多态水平。如何对现有繁殖群体较高的多态性水平进行利用和保护, 最大限度地避免近交衰退, 成为现阶段急需解决的问题。本研究借鉴大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[7]、美国虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]等水产动物遗传改良的成功经验, 将鲤微卫星多态标记应用于镜鲤家系的构建及选育, 通过对养殖繁育群体的遗传结构分析, 预测能够繁育出具有生长优势子代的最佳亲本配组, 并跟踪分析了繁育获得的子一代的遗传多样性水平及生长性状, 建立了分子标记辅助家系构建及选育技术体系, 为现有优良种的持续利用及多样性保护探索一条新的途径。

收稿日期: 2007-11-26; 修订日期: 2008-06-18.

基金项目: 国家重大基础研究计划资助项目 (2004CB117405); 农业部“引进国际先进农业科学技术”计划 [2006-G55(A)]; 黑龙江水产研究所基本科研业务费专项 (2007HSYZX-SJ-16).

作者简介: 鲁翠云 (1980-), 硕士, 研究实习员, 从事水产动物基因工程育种研究. E-mail: xtlcy_123@163.com

通讯作者: 孙效文. Tel: 0451-84842646; E-mail: sunxw2002@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

镜鲤亲本繁育群体于2006年4月采自黑龙江水产研究所松浦实验站,共131尾,包括雌性个体75尾,雄性个体56尾,年龄在3~4龄,体质量3~6 kg。采用剪取不同组合鳍条缺刻的方法作一对一的标记,编号并提取基因组DNA。

分析亲本群体的遗传结构,根据个体遗传关系绘制个体亲缘关系图谱,建立一对一亲本繁育家系40个,成活35个。2006年6月27日编号入网箱养殖,每个家系入网箱200尾,于8月23日测量了各家系2月龄鱼种的生长性状,并对其中4个家系

(依据网箱编号为1-1、2-4、3-4和4-3,其中1-1和4-3为同父本的半同胞家系)的1龄鱼种(40尾)的遗传结构进行了分析。于2007年4月用同一繁殖群体进行了重复实验,依据遗传距离建立家系35个,改善网箱养殖条件,每个家系入网箱分别养殖200尾,测量2月龄鱼种的生长性状。

1.2 引物与试剂

本研究所用的28个微卫星分子标记为本实验室通过磁珠富集的方法开发^[9],由上海生工生物工程公司合成,引物信息见表1。实验所用的Taq DNA聚合酶、dNTP及生化试剂均购自上海生工生物工程公司。

表1 微卫星引物序列及扩增情况
Tab.1 Sequence and amplified results of microsatellite loci

座位 Locus	引物序列 (5' 3') Primer sequence (5'-3')	核心序列 Motif	退火温度 /℃ Annealing temperature	座位 Locus	引物序列 (5' 3') Primer sequence (5'-3')	核心序列 Motif	退火温度 /℃ Annealing temperature
HLJ019	F: actgctggctcaggaaca R: gagcaaatggttagctc	(CA) ₂₆	53	HLJ319	F: cagtgggattgfgggagt R: agggagggtcaaaagtc	(CA) ₁₄	53
HLJ038	F: cacagaacgcacagtaaa R: tgtaaacctcaacctcc	(CA) ₄₁	53	HLJ328	F: cctgacacctgccgttct R: tctctgtttctgcctccc	(CA) ₃₀	51
HLJ041	F: agaccaccgcagtaacaa R: gactcactcagcaccaga	(CA) ₂₄	53	HLJ331	F: ctactcggaggtgtatgtg R: tgggaagactcgttctatg	(CA) ₂₈	50
HLJ044	F: gtacagcgtgacagcatt R: aagttcatcggtgtcctc	(CA) ₂₈	53	HLJ338	F: aagaatgggtgagtaaga R: actaggatttgaagagac	(AC) ₅₈	51
HLJ046	F: aacctgaactcacaaac R: caccgaaactgagaagac	(GT) ₁₄	53	HLJ343	F: tcttcacaacctccgtat R: caaaggcatcccatcagt	(TG) ₃₂	51
HLJ049	F: gatttgtctcctcaacc R: ctgtcacttctctcca	(GT) ₂₈	54	HLJ352	F: gacggacagaatcagacg R: cagcctcatcaacaagtgc	(AC) ₃₁	54
HLJ055	F: ggtacaacgggaaccaca R: tgattgacaggcagtgagg	(CT) ₁₁ (CA) ₂₉	54	HLJ371	F: gtgctcacccatgacagg R: caaagtgcacaacaaccc	(CA) ₁₆	54
HLJ057	F: gaatgtcatcggttcat R: tatttgtgggtgtcctc	(GT) ₂₃	54	HLJ372	F: tctacttctaccgccact R: gactattcacctgcattt	(GT) ₁₈ AT (GT) ₅	54
HLJ058	F: cagatggcagacaggtaa R: gagcaagtggaggaaacag	(CA) ₂₁	53	HLJ376	F: agaaggactacgaggaga R: ttcggttgcttactatga	(CA) ₁₃	54
HLJ060	F: cgatcactggcaagatta R: atggactacacctcacc	(GT) ₂₃	54	HLJ379	F: gggagacgagaagtga R: gcaggtctgtgggcaag	(CT) ₁₃ CG (CT) ₅	54
HLJ133	F: aaggcgggttatctcac R: cacaggcatcccatcagt	(GT) ₂₅	51	HLJ383	F: ggctcctctcatcctct R: gcacttctgcacatttca	(CA) ₁₄	51
HLJ302	F: acctcattgaaatccctg R: aaatagagttgtttgctga	(CA) ₂₃	50	HLJ392	F: ggctacaaggcaacactg R: tgcggttaagaggctctg	(CA) ₂₂	54
HLJ307	F: atcatttgtatcgtgcttg R: gatccactgggtcctttt	(CA) ₁₈	53	HLJ398	F: attacttgaaactatcatccag R: tgtgctgaggattattgg	(CT) ₁₆ (CA) ₁₀	54
HLJ315	F: accctcctcttagtgcc R: aaaggtagcctgtgagc	(AC) ₃₀	51	HLJ400	F: aagaagcctcggtcctcc R: aaagcccaagcacatca	(CA) ₂₂	51

注: F-正向引物; R-反向引物。

Note: F-Forward primer; R-Reverse primer.

1.3 DNA提取

取镜鲤鳍条约0.2 g,加入裂解液400 μL(0.5%十二烷基肌氨酸钠,200 μg/mL蛋白酶K,10 mmol/L EDTA (pH 8.0)),50℃消化2 h,用酚、氯仿、异戊

醇混合液(体积比为25:24:1)抽提3次,无水乙醇沉淀,自然干燥后溶解于200 μL TE。1%琼脂糖凝胶电泳检测定量,4℃保存备用。

1.4 PCR扩增及检测

建立 15 μ L 反应体系, 包括 PCR 混合缓冲液 10 μ L (10 mmol/L Tris-Cl (pH8.3), 50 mmol/L KCl, 15 mmol/L $MgCl_2$, 0.01% 明胶, 0.1% Tween-20, 0.1% NP-40, dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 2 mmol/L), 微卫星上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.3 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 (50 ng/ μ L) 1 μ L, 补充无菌水到 15 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 50~54 $^{\circ}C$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带的大小。

1.5 数据处理

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。用 PopGene (Version 3.2) 软件统计各微卫星基因座的等位基因频率 (Allele frequency, P)、等位基因数 (Observed number of alleles, A_o)、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)、多态信息含量 (Polymorphism Information content, PIC) 由 Botstein 等^[10] 公式计算:

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

其中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j=i+1$ 。

用 Genepop (Version 3.4) 软件进行 χ^2 检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离。偏离指数 (d) 能够从直观上表明群体杂合子的缺失或过剩, 由下列

公式计算:

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

用自行编制的软件 (专利申请号: 200710144749.3) 处理个体间遗传数据, 将其转化为 PHYLIP 3.6 识别数据格式, 用 PHYLIP 3.6 软件的 Genedist 程序计算个体间的遗传距离, 用 Neighbor 程序绘制聚类图, 经过 1 000 次抽样自举检验, 选定唯一聚类图。依据雌、雄个体的遗传距离及聚类图, 以避免近亲繁育为原则, 选择处于不同分支的亲本进行 1 对 1 的交叉繁育。体质量等数量性状由 Excel2003 处理。

2 结果与分析

2.1 镜鲤亲本群体的遗传结构

28 个微卫星位点在松浦镜鲤亲本群体共 131 个个体均获得了稳定、清晰的 DNA 条带, 并在个体间表现出不同程度的多态性。共检测到 146 个等位基因, 位点等位基因数在 3~9 个不等, 平均等位基因数 5.214 3 个, 片段长度在 108~400 bp 之间。有效等位基因数在 1.184 1~6.327 8 之间, 观察杂合度在 0.152 7~1.000 之间, 期望杂合度在 0.155 5~0.842 0 之间, 位点多态信息含量在 0.146 5~0.824 3 之间, 其中中度多态 ($0.25 \leq PIC \leq 0.5$) 6 个, 高度多态 ($PIC \geq 0.5$) 19 个。松浦镜鲤亲本群体在 28 个位点的有效等位基因数、观察杂合度、期望杂合度和多态信息含量 4 项统计指标的均值分别为 3.058 5、0.572 2、0.597 2、0.562 7, 显示出较高的多态性 ($PIC > 0.5$) 水平。部分琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

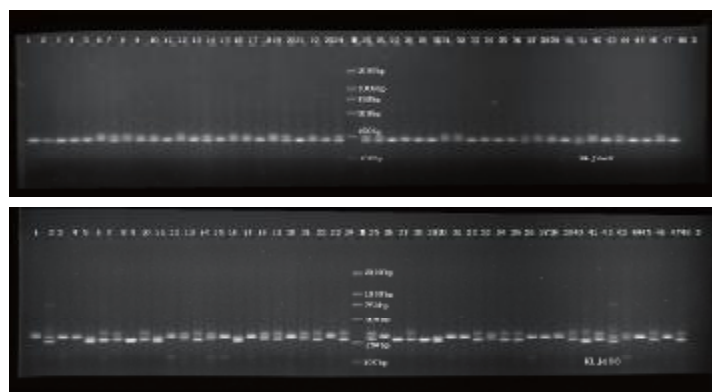


图 1 部分镜鲤亲本个体在 *HLJ046* 和 *HLJ400* 位点的电泳图谱

M: DL2000 DNA 分子量标准; D: 阴性对照; 1-48: 部分个体编号

Fig. 1 Electrophoretogram of loci *HLJ046* and *HLJ400* in partial samples of *C. carpio* population

M: DL2000 DNA molecular marker; D: negative control; 1-48: Codes of partial samples

用 Genepop (Version 3.4) 软件分析了群体的 Hardy-Weinberg 遗传偏离。结果表明松浦镜鲤亲本群体整体保持遗传平衡状态 (Multi-loci test, $P=1$), 但在 *HLJ019*、*HLJ046*、*HLJ055* 及 *HLJ058* 4 个位点极显著偏离平衡 ($P < 0.01$), 表现为杂合子严重过剩;

而 *HLJ049*、*HLJ057* 等 6 个位点则表现为杂合子显著不足 ($P < 0.01$)。Hardy-Weinberg 遗传偏离指数从直观上表明了杂合子的缺失或过剩, 统计结果显示, 16 个位点 (57.14%) 表现为杂合子缺失。详细统计数据见表 2。

表 2 松浦镜鲤亲本群体在 28 个微卫星位点的多样性参数及 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析
Tab. 2 Genetic diversity index and Hardy-Weinberg equilibrium analysis of 22 microsatellite loci for *C. carpio* population

位点 Locus	片段大小 /bp Fragment size	A_e	N_e	H_o	H_e	PIC	P	d
<i>HLJ019</i>	181-211	3	2.5976	1.0000	0.6150	0.5409	0.0000**	0.6260
<i>HLJ038</i>	250-364	6	4.4412	0.7023	0.7748	0.7414	0.9786	-0.0936
<i>HLJ041</i>	246-305	3	1.1841	0.1679	0.1555	0.1465	0.3822	0.0797
<i>HLJ044</i>	228-340	6	3.9423	0.7557	0.7463	0.7031	0.2942	0.0126
<i>HLJ046</i>	108-246	4	1.5322	0.4046	0.3473	0.3117	0.0070**	0.1650
<i>HLJ049</i>	173-236	6	4.2134	0.5954	0.7627	0.7245	0.9985	-0.2193**
<i>HLJ055</i>	250-364	9	6.3278	0.9618	0.8420	0.8243	0.0000**	0.1423
<i>HLJ057</i>	266-352	5	1.7285	0.2290	0.4214	0.4001	0.9962	-0.4566**
<i>HLJ058</i>	281-365	4	2.8448	1.0000	0.6485	0.5933	0.0000**	0.5421
<i>HLJ060</i>	196-246	4	1.3465	0.2748	0.2574	0.2403	0.8375	0.0676
<i>HLJ133</i>	240-340	5	4.0642	0.7176	0.7539	0.7117	0.6280	-0.0481
<i>HLJ302</i>	203-293	6	3.9401	0.6794	0.7462	0.7146	0.7169	-0.0895
<i>HLJ307</i>	195-275	7	1.5990	0.3511	0.3746	0.3584	0.8305	-0.0627
<i>HLJ315</i>	109-224	7	3.1066	0.8092	0.6781	0.6409	0.9936	0.1933
<i>HLJ319</i>	237-353	7	4.0407	0.7328	0.7525	0.7228	0.9610	-0.0262
<i>HLJ328</i>	250-375	7	5.0105	0.7252	0.8004	0.7733	0.8397	-0.0940
<i>HLJ331</i>	201-246	5	4.0594	0.7176	0.7537	0.7142	0.5634	-0.0479
<i>HLJ338</i>	210-297	5	3.8212	0.6870	0.7383	0.6951	0.6469	-0.0695
<i>HLJ343</i>	121-195	5	3.4264	0.4885	0.7081	0.6828	1.0000	-0.3101**
<i>HLJ352</i>	256-306	5	3.2176	0.6565	0.6892	0.6513	0.1778	-0.0475
<i>HLJ371</i>	135-206	5	1.7109	0.1527	0.4155	0.3815	1.0000	-0.6325**
<i>HLJ372</i>	272-360	4	3.4519	0.3359	0.7103	0.6565	1.0000	-0.5271**
<i>HLJ376</i>	230-300	3	1.2743	0.2366	0.2153	0.2038	0.1334	0.0989
<i>HLJ379</i>	207-269	5	2.2073	0.6107	0.5470	0.5115	0.9775	0.1165
<i>HLJ383</i>	246-322	5	2.4409	0.3588	0.5903	0.5621	1.0000	-0.3922**
<i>HLJ392</i>	124-220	6	2.1285	0.5573	0.5302	0.4842	0.5127	0.0511
<i>HLJ398</i>	118-178	3	1.6005	0.4122	0.3752	0.3260	0.9999	0.0986
<i>HLJ400</i>	280-400	6	4.3795	0.7023	0.7717	0.7398	0.3966	-0.0899
Mean	—	5.2143	3.0585	0.5722	0.5972	0.5627	—	—

2.2 镜鲤亲本个体间的遗传分化与1对1繁殖配组

用 28 个微卫星标记进一步分析了镜鲤亲本个体间的亲缘关系。用 PHYLIP 3.6 软件包内的 gendist 程序计算了个体间的遗传距离在 0.105 0~0.994 3 之间, Neighbor 程序绘制的聚类图

显示, 多数亲本个体具有相似的遗传背景, 在同一节点处有 127 个个体分为大小不同的 27 个小分支, 分支内含的个体数在 2~10 个不等, 只有 4 个个体以不同大小的遗传距离聚到大分支之外。亲本个体的聚类结果见图 2。

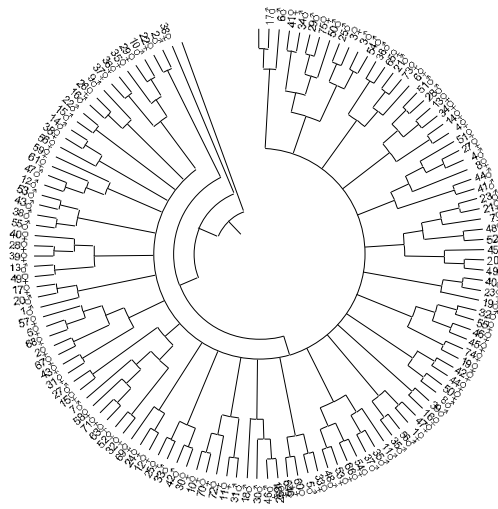


图2 基于标准遗传距离的镜鲤亲本个体聚类图

Fig. 2 Dendrogram of *C. carpio* individuals based on standard genetic distance using UPGMA

依据雌、雄亲本的遗传距离及聚类图,选取亲本遗传距离大于0.2,处于不同分支的组合建立1对1繁育的亲本家系40个,成活35个。编号入网箱养殖,每组入网箱200尾。

2.3 家系2月龄子代生长情况

2006年度和2007年度2月龄鱼种的生长性状见表3。2007年度对网箱养殖条件进行了改善,在大水面池塘平行建立标准3 m×4 m网箱,2月龄鱼种的生长情况好于2006年度。方差分析表明,家系间体长、体质量差异均极显著,具备进一步培养筛选优良家系的潜力。两年的统计结果均显示家

系的体长、体质量与家系亲本间的遗传距离具有一定的相关性,但并不显著,相关系数仅为0.177 3和0.193 4。2007年度的测量数据显示,具有生长优势的家系出现在亲本遗传距离在0.6~0.7之间,家系平均体长为9.69 cm,平均体质量为31.34 g,显著大于遗传距离在0.5~0.6范围的家系($W=26.16$ g, $L=9.30$ cm)。不同亲本遗传距离范围的家系体质量见表4。可见在一定范围内随着亲本遗传距离的增大,家系表现出生长优势,但是随着遗传距离的进一步增大,体质量有下降的趋势。

表3 2006年度和2007年度所建镜鲤家系的2月龄生长情况
Tab.3 Growth condition of two-month-old families of *C. carpio* in 2006 and 2007

项目 Item	2006		2007	
	体长 /cm Body length	体质量 /g Body weight	体长 /cm Body length	体质量 /g Body weight
最大值 Maximum	9.41	34.55	10.60	40.63
最小值 Minimum	7.24	14.02	8.49	16.92
平均值 Mean	8.44	22.88	9.48	28.24

表4 镜鲤家系平均体质量与亲本遗传距离的关系
Tab. 4 Relation of average body weight of *C. carpio* families with parental genetic distance

项目 Item	亲本遗传距离范围 (D) Range of parental genetic distance			
	$0.4 \leq D < 0.5$	$0.5 \leq D < 0.6$	$0.6 \leq D < 0.7$	$D \geq 0.7$
最大值 /g Maximum	34.53	39.22	40.63	36.10
最小值 /g Minimum	18.17	19.46	20.00	16.92
平均值 /g Mean	25.61	26.16	31.34	27.68

2.4 4个家系1龄鱼种的生长情况及遗传结构

对35个家系用剪取不同鳍组合的方式进行标记,入池塘混合养殖并越冬。于2007年5月随机测定了其中4个家系的体长和体质量,其中1-1和4-3家系为同父本的同胞家系。结果4个家系的平均体长为11.71 cm,体长差异不显著($P>0.05$),与2月龄的测量结果相符;平均体质量为57.70 g,差异显著($P<0.05$),与2月龄的测量结果略有差异($P>0.05$)。其中以4-3家系的平均体质量最大,为62.83 g。

用15对微卫星标记分析了4个家系1龄鱼种的遗传结构,部分位点的扩增图谱如图3所示。结果4个家系均处于中度多态水平($0.25<PIC<0.5$),其中以4-3家系的遗传多样性水平最高,平均多态信息含量为0.407 7,详细统计数据见表5。4个家系的遗传距离为0.055 5~0.255 2,近交系数(F_{st})为0.153 7,符合Wright群体间遗传分化较大的标准(F_{st} 在0.15~0.25),说明家系间出现了较大的遗传分化,便于进一步的选育。

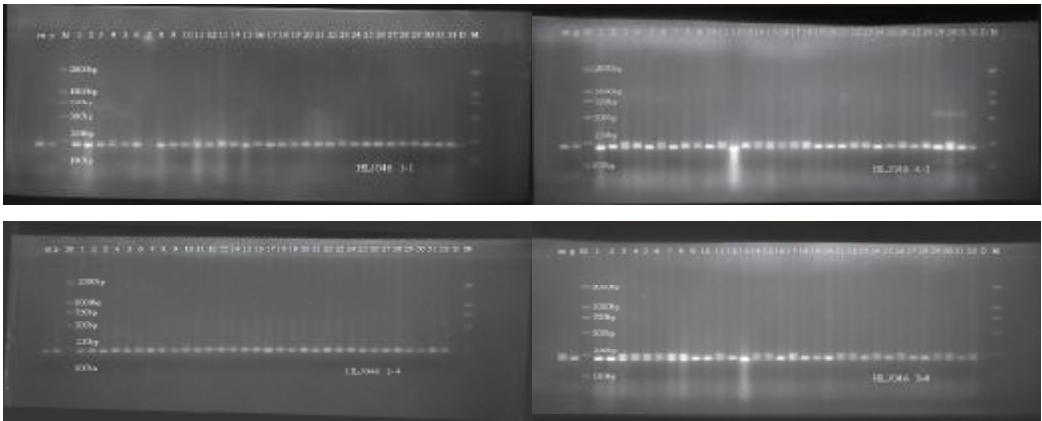


图3 4个镜鲤家系在位点HLJ046的扩增结果

m: 母本; p: 父本; M: DL2000 DNA 分子量标准; D: 阴性对照; 1-32: 子代样本

Fig. 3 Amplified results of four *C. carpio* families by locus HLJ046

m: maternity; p: paternity; M: DL2000 DNA molecular marker; D: negative control; 1-32: samples of progeny

表5 镜鲤4个家系的数量性状及遗传结构
Tab. 5 Quantitative traits and genetic structure of four *C. carpio* families

项目 Item	家系 Family			
	1-1	2-4	3-4	4-3
体长 /cm Body length	11.83±0.2202	11.40±0.1275	11.61±0.2010	11.99±0.1675
体质量 /g Body weight	60.24±3.3833	55.20±1.9963	52.52±2.7971	62.83±2.6679
亲本间遗传距离 Genetic distance between parents	0.6470	0.3620	0.5809	0.4669
平均等位基因数 Average of alleles number	2.7333	2.1333	2.7333	2.8667
平均有效等位基因数 Average of effective alleles number	2.0883	1.6768	2.0763	2.1394
平均观测杂合度 Average of observed heterozygosity	0.5604	0.3958	0.5083	0.5513
平均期望杂合度 Average of expected heterozygosity	0.4486	0.3416	0.4612	0.4816
平均多态信息含量 Average of polymorphic information content	0.3813	0.3056	0.3966	0.4077

2.5 与体质量相关的基因型

对4个家系的基因型及体质量的相关性进行分析。结果 *HLJ371*、*HLJ379*、*HLJ392* 和 *HLJ400* 4个位点不同基因型个体体质量差异显著 ($P<0.05$), *HLJ371* 的杂合基因型 192 bp/156 bp 和纯合基因型 192 bp、*HLJ379* 的纯合基因型 207 bp、*HLJ392* 的杂合基因型 179 bp/156 bp 和 *HLJ400* 的杂合基因型 324 bp/294 bp 具有生长优势, 1-1 和 4-3 家系在 *HLJ379* 位点已经全部纯合, 家系平均体质量达 61.54 g; 而 2-4 家系在 *HLJ392* 位点和 3-4 家系在 *HLJ371* 位点的纯合致使两个家系的平均体质量仅为 53.86 g。

3 讨论

3.1 养殖群体的遗传潜力评估

目前, 中国主要养殖经济鱼类的苗种多数来源于野生群体驯化和引种后的人工繁殖, 受生产规模的限制, 生产单位保存的亲鱼数量不多, 且大部分选于自繁后代, 经过多年生殖隔离和多代近交, 引起了养殖性状不同程度的退化, 如性早熟、成熟个体趋小、抗病力降低等。研究表明, 相比于野生群体, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 养殖群体平均有 40% 的等位基因丢失, 期望杂合度平均值也显著低于野生群体^[11]; Kohlmann 等^[12] 在鲤群体也发现了相似的趋势, 13 个养殖群体的平均等位基因数为 4.436 个, 显著低于 9 个野生群体的均值 8.221 个, 养殖群体遗传多样性明显下降致使遗传潜力的降低。因此, 在品种建立和保持过程中如何利用分子标记来避免近亲繁殖带来的种质衰退并使所选育的品种遗传本质和生产性能不断提高是水产育种学家必需解决的课题。本研究利用 28 个微卫星标记评估了黑龙江水产研究所松浦实验站的镜鲤亲本群体, 平均等位基因数为 5.214 3 个, 与全迎春等^[5] 用 30 个微卫星标记检测的 5 个镜鲤养殖群体的平均等位基因数 ($A_e=4.75\sim5.72$) 相近。最大限度地维持种内遗传多样性水平, 是评价群体遗传潜力和持续利用种质资源的前提。 A_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 等都是反映群体遗传多样性和遗传潜力的度量, 其数值越大, 说明基因丰富度越高, 遗传潜力越大。松浦镜鲤亲本群体在有效等位基因数、观察杂合度、期望杂合度和多态信息含量 4 项统计指标的均值分别为 3.058 5、0.572 2、0.597 2、0.562 7, 显示群体处于高度多态 ($PIC>0.5$) 水平, 遗传多样性较好, 具备进

一步生产及选育优良种质的潜力。但是, 群体在过半 (57.14%) 的微卫星位点表现为杂合子缺失, 某些位点少数等位基因的富集较为严重, 某个等位基因的频率甚至达到 0.8 以上, 稀有等位基因大量丢失, 表现出明显的人工选择趋向, 这一点在其他养殖种类也较为明显^[11], 对优良种质资源的保护和持续利用是极为不利的。

3.2 微卫星辅助家系建立及选育体系构建及效应评估

家系选育作为传统的选择育种手段, 在鱼类育种中发挥了重要作用。运用大规模家系选育不断进行遗传改进, 不仅避免了在养殖过程中经济性状的衰退现象, 而且还使经济性状获得了不断地改进, 挪威大西洋鲑和美国优质虹鳟就是大规模家系选育的成功范例^[13]。家系建立及选育的成功很大程度上取决于配组亲本的选择, 仅根据传统经验, 如亲本性状互补, 亲缘关系及地理条件相距较远等, 作为选配亲本的原则, 工作量大, 准确性小, 往往达不到预期目的。分子标记由于直接反映的是亲本间基因组水平上的遗传差异, 能够在一定程度上预测后代杂交优势的产生, 因此备受育种学家的推崇。用分子标记技术揭示的遗传差异辅助亲本选配在玉米^[14]、水稻^[15] 等作物和羊^[4]、牛^[16] 等畜类已有应用, 但遗传距离与杂种优势产生的相关性没有明确的结论。Lee 等^[17] 研究发现 RFLP 遗传距离与 F_1 杂种优势表现存在高度的相关性, 可用于杂种优势预测; 而 Boppenmaier 等^[18] 则认为没有预测价值。本研究选用微卫星标记辅助进行家系亲本的选配, 通过微卫星标记揭示镜鲤亲本个体之间的遗传差异, 选择个体遗传距离大于 0.2, 并且处于不同聚类分支的亲本建立家系。对家系子代的生长指标的统计结果表明, 体长、体质量与双亲间的遗传距离均呈现正相关关系, 但相关性较小, 相关系数仅为 0.177 3 和 0.193 4, 并不能通过遗传距离对育种优势进行绝对预测。但是结合鳞被、体型、生长等数量性状留待进一步培养的育种组合其亲本的遗传距离均较大, 多数在 0.5~0.7 之间。Smith 等^[19] 的分析也表明亲本间的遗传距离并不是越大越好, 在一定程度上随着遗传距离的增大杂种优势提高, 当遗传距离过大, 杂种优势反而降低。陈平华等^[20] 通过对子代性状的分析证实亲本间遗传距离中等偏大的配组较好, 其他学者通过不同的研究也得出了相似的结论^[21-22]。

水产动物的生长环境较农作物难以控制,由于网箱养殖的局限性,往往致使组间差异较大,利用电子标记或者剪取标记的方法入大池养殖,可以尽可能减小环境因素造成的差异。本研究对2006年混养后的4个家系1龄鱼种的检测结果与2月龄相比差距较大,其中4-3家系从体质量为19.54 g的最小组合增加到62.83 g的最大组合,遗传结构分析也以4-3组合的遗传多样性水平最高,与混养后的测量结果相符。此结果表明,家系选育不易过早根据数量性状进行选择,而采用分阶段测量、逐级选种的方法比较合理。但是,网箱养殖和后期混养的测量数据均表明家系间生长差异显著,同时在保持中度多态水平($0.25 < PIC < 0.5$)的基础上产生了较大的遗传分化($F_{st}=0.153$),具备进一步培育、筛选优良家系的潜力。可见,用微卫星辅助进行家系的建立及选育是可行的。另外,本研究还发现家系在HLJ371、HLJ379、HLJ392和HLJ400 4个位点的5种基因型具有显著的生长优势,有望在今后的家系选育过程有意识的富集有利基因型,从而达到指导选育的目的。

3.3 微卫星辅助鱼类家系选育存在的问题

微卫星分子标记辅助进行家系的建立及选育,从基因组水平上评估了亲本个体的遗传差异,最大限度地避免了近亲繁育,对现有种质资源的遗传改良和保护具有重要意义。本研究从家系子代的生长、遗传结构以及遗传分化3方面评估了微卫星辅助家系选育的效果,证实微卫星标记指导亲本选配能够大幅度地避免近交衰退、加快家系选育过程,通过数代的选育达到对现有良种进行遗传改良的目的。但是,就目前而言微卫星标记辅助家系选育在水产动物的推广还具有一定的难度,一方面主要养殖鱼类的微卫星标记还不够多,与性状紧密连锁并推广应用的标记更是少之又少,有研究证实,无选择地增加标记数量及并不能提升选配的效果^[14,23],由于水产动物生境难以控制,与性状连锁的标记的鉴定和使用还存在一定的困难;另一方面标记辅助的家系选育需要在繁殖期短时间内完成大量的基因型分析工作;另外,混合养殖时分子标记的使用也存在一定的局限性。

参考文献:

- [1] HE F H, Xi Z Y, Zeng R Z, et al. Developing single segment substitution lines (SSSLs) in rice (*Oryza sativa* L.) using advanced backcrosses and MAS[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32 (8): 825-831.
- [2] Guo W Z, Zhang T Z, Ding Y Z, et al. Molecular marker assisted selection and pyramiding of two QTLs for fiber strength in upland cotton[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32 (12): 1 275-1 285.
- [3] Zhang J H, Xiong Y Z, Zuo B, et al. Detection of quantitative trait loci associated with several internal organ traits and teat number trait in a pig population[J]. *J Gen Genom*, 2007, 34 (4): 307-314.
- [4] 张英杰, 赵有璋, 刘月琴, 等. 3个山羊群体中4个微卫星DNA多态性及其与杂种优势的关系[J]. *遗传*, 2004, 26 (5): 631-636.
- [5] 全迎春, 李大字, 曹顶臣, 等. 微卫星DNA标记探讨镜鲤的种群结构与遗传变异[J]. *遗传*, 2006, 28 (12): 1 541-1 548.
- [6] 侯宇, 张研, 鲁翠云, 等. 微卫星DNA标记分析德国镜鲤的遗传潜力[J]. *遗传*, 2007, 29 (12): 1 509-1 518.
- [7] 胡红浪. 挪威大西洋鲑良种选育的发展历程[J]. *中国水产*, 2003, 6: 69-70.
- [8] 张玉勇, 王丙谦, 牟振波. 常规育种技术在鲢鳙鱼类品种遗传改良种的作用[J]. *安徽农学通报*, 2007, 16: 149-152.
- [9] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 微卫星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.
- [10] Botstein D, White R I, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Human Genet*, 1980, 32: 314-331.
- [11] 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.
- [12] Kohlmann K, Kersten P, Flajshans M. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp populations[J]. *Aquaculture*, 2005, 247: 253-266.
- [13] 李鸿鸣, 孙效文. 应用大规模家系选育技术促进辽宁海水养殖业的可持续发展[J]. *沈阳农业大学学报*, 2002, 4 (1): 7-10.
- [14] 袁力行, 傅骏骅, 刘新芝, 等. 利用分子标记预测玉米杂种优势的研究[J]. *中国农业科学*, 2000, 33 (6): 6-12.
- [15] Zhang Q, Gao Y J, Saghai Maroof M A, et al. Molecular

- divergence and hybrid performance in rice[J]. Molecular Breed, 1995 (1): 133-142.
- [16] 孙少华, 桑润滋, 师守堃, 等. 肉牛杂交优势预测、评估及其应用研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(7): 580-589.
- [17] Lee M, Godshalk K, Lamkey K R, et al. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses[J]. Crop Science, 1989 (29): 1 067-1 071.
- [18] Boppenmaier J, Melchinger A E, Brunklaus-fune E, et al. Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds. 1. Relation to performance of flint×dent crosses for forage trait[J]. Crop Science, 1992 (32): 895-903.
- [19] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F_1 grain yield, grain yield heterosis and RFLPs[J]. Theor Appl Genet, 1990 (80): 833-840.
- [20] 陈平华, 张辉, 陈如凯. 利用 RAPD 技术进行甘蔗育种亲本辅助选择[J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 675-681.
- [21] 高世斌, 荣廷昭, 李晚忱, 等. 19 个玉米自交系的数量性状和 AFLP 遗传差异比较研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 24-27.
- [22] 李伯群, 余国东, 石有明, 等. 两系杂交小麦杂种优势、配合力及遗传距离分析[J]. 麦类作物学报, 2003, 23(3): 17-21.
- [23] 龚明川, 赖松家. 微卫星多态性与动物杂种优势预测[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(4): 62-65.

Families construction assisted by microsatellite markers in mirror carp *Cyprinus carpio* L.

LU Cui-yun, CAO Ding-chen, SUN Xiao-wen, LIANG Li-qun

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

Abstract: Superior family can be established and selected from optimum breeding pairs by means of microsatellite markers to analyze genetic structure of reproductive population. In this study, twenty-eight markers were used to evaluate the genetic potential of reproductive population including 131 samples (76 females and 55 males) of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). Totally 146 alleles were detected ranging from 108 bp to 400 bp. Several genetic parameters were used to evaluate the parental population. The average number of alleles was 5.214 3 and the effective alleles mean was 3.058 5. The value of mean observed heterozygosity was 0.572 2 and the value of mean expected heterozygosity was 0.597 2. The mean value of polymorphic information content was 0.562 7, which indicates that the genetic variability was relatively high and selection of excellent population is possible. The population accorded with Hardy-Weinberg equilibrium checking by χ^2 test and genetic departure index, but heterozygote deficit of sixteen loci occurred such as *HLJ049*, *HLJ057* and *HLJ343* after a long time's artificial selection. A total of seventy families were established based on genetic distance of breeding pairs after two consecutive years. The offspring of each family were cultured separately in net-cage. The body length of the two months old family ranged from 7.24 cm to 10.60 cm and body weight were from 14.02 g to 40.63 g. The differences of body length and body weight were significant among families. The later study results of growth and genetic structure to the four families of one year old from 2006 indicated that there were significant genetic differentiation and the F_{st} value was 0.153 7. The PIC ranged from 0.305 6 to 0.407 7, which revealed that the four families were detected in medium diversity. These results demonstrated that microsatellite could be used for assisting families selection due to its capacity to predict growth superiority of offsprings. It was feasible to use this method for genetic improvement of the mirror carp. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 893-901]

Key words: microsatellite; mirror carp (*Cyprinus carpio* L.); family selection

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