

2个锦鲤人工养殖群体遗传多样性的微卫星标记分析

陈万光¹, 王 慧²

(1. 洛阳师范学院生命科学系, 河南 洛阳 471022; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 采用13对微卫星引物, 对2个锦鲤(*Ornamental carp*)人工养殖群体的遗传多样性进行了研究。结果表明, 锦鲤群体的遗传多样性水平较高; 其平均等位基因数(A)为7.86和8.37; 2个群体的平均观测杂合度(H_o)为0.7911和0.7928, 平均期望杂合度(H_e)为0.6735和0.6792, 平均多态信息含量为0.7145和0.7192。群体间的遗传距离为0.1057, 遗传相似度为0.9011。13个微卫星位点可用于锦鲤群体的遗传学研究。

关键词: 锦鲤; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: S912 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2009)01-0045-04

锦鲤(*Ornamental carp*)是一种体色鲜艳、斑纹华丽的变种鲤鱼, 目前世界上现存的锦鲤品种有100多种, 其中我国常见的品种有红白、大正三色、昭和三色、写鲤、浅黄、衣、金银鳞、变种锦鲤等13个品系。近年来锦鲤养殖技术日趋成熟, 养殖者也逐年增多, 逐渐成为发展农村经济新的增长点; 但经过连续多年的人工繁殖, 锦鲤养殖群体内由于近交而导致锦鲤个体品质的下降。随着养殖规模的不断扩大, 如何最大限度地保持养殖群体的遗传多样性, 维持其优良的品质, 已成为人们关注的焦点。

微卫星作为一种分子遗传标记, 拥有较高的个体特异性和可重复性(Zhou J et al, 2004), 并且能够提供丰富的多态位点及基因座位杂合度和纯合度等的遗传信息(Desvignes J F et al, 2001), 因而被广泛应用于群体遗传多样性研究、遗传作图、亲子鉴定、品种鉴定和群体进化研究等诸多研究领域(Rana R S et al, 2004; Dietrich W et al, 1992; Roques S et al, 2002; BANKS M A et al, 2000; 林凯东和罗琛, 2003)。本文采用微卫星标记技术, 对2002年以来开始自繁培育的锦鲤后代群体和天津换新水产良种场的锦鲤群体的遗传多样性进行了比较研究, 以便为锦鲤的遗传多样性评价提供基因组水平的直接证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

分别从山东省淡水所2002年后自繁培育的锦鲤群体(记为ZF)和天津换新水产良种场的锦鲤群体(记为HX)中各随机抽取30尾, 剪取少量尾鳍, 洗净后放入冰盒中带回实验室。

1.2 基因组DNA提取

分别将采集的每尾锦鲤的尾鳍用蒸馏水冲洗3遍, 凉干, 取0.1g在含有液氮的研钵中研成粉末, 加入0.2 mL DNA裂解液[10 mmol/L Tris - Cl (pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 200 μ g/mL 的 Proteinase K], 50℃温育5~6h后, 用等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提2遍, 离心, 取上清, 加入2倍体积的冷无水乙醇沉淀DNA, 70%的乙醇洗涤2遍, 真空抽干, 溶于100 μ L浓度为0.1 $\times$ TE (pH 8.0)中, 电泳检测DNA质量, 4℃保存(马洪雨等, 2005)。

1.3 微卫星PCR扩增检测

PCR反应体系: 总体积为25 μ L, 含有10 $\times$ buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1 μ L, DNA模板1 μ L; 上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L, dNTPs (各2 mmol/L) 1 μ L, Taq DNA聚合酶(Promega) 1U, 加灭菌双蒸水至终体积25 μ L。

PCR反应程序: 94℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 退火(温度见表1)50 s, 72℃延伸50 s, 35个循环; 72℃延伸10 min。扩增产物用10%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染, 拍照保存。

1.4 数据处理

统计分析锦鲤养殖群体在13个微卫星位点上的等位基因组成、基因频率及其分布, 对多态位点进

收稿日期: 2007-12-06

基金项目: 科技部“十五”攻关项目资助(04033810); 河南省教育厅科技攻关项目(2004601011)。

通讯作者: 王慧, 1963年生, 女, 山东济南人, 教授, 博士, E-mail: yqzeng@sdaa.edu.cn

作者简介: 陈万光, 1964年生, 男, 河南洛阳人, 教授, 研究方向为水产动物增殖学。E-mail: chwqxql@163.com

行分析,应用 LabImage (Version 2. 7. 2) 软件辅助确定基因型,并计算各等位基因的大小;利用 POP-GENE32 (Version 1. 31) 软件计算平均等位基因数 (A)、平均观测杂合度 (H_o)、平均期望杂合度 (H_e)、微卫星位点的多态信息含量 (PIC) 和 Hardy – Weinberg 偏离指数 (d)。根据 Nei M (1978) 计算 2 个群体的遗传距离。

$$A = (1/n) \sum X_i$$
$$H_o = \text{杂合子观测数} / \text{观察个体总数}$$
$$H_e = 1 - \sum f_i^2$$
$$d = (H_o - H_e) / H_e$$
$$PIC = 1 - \sum f_i^2 - \sum 2f_i^2 \cdot f_j^2$$

表 1 锦鲤人工养殖群体的微卫星标记及其遗传多样性

Tab. 1 Microsatellite marker and genetic diversity of the artificial breed Ornamental carp population

位点 Locus	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	平均等 位基因数 A	观测杂 合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态信 息含量 PIC	遗传偏 离指数 d
MFW1	F: GTCCAGACTGTCATCAGGAG R: GAGGTGTACTGAGTCACGC	56	13	1. 0000	0. 7341	0. 6923	0. 362
MFW3	F: GATCAGAAGGTACAGAGAAG R: CCTTACAGAAAACCTGTTTGC	55	10	0. 6833	0. 7720	0. 7986	-0. 115
MFW4	F: TCCAAGTCAGTTTAATCACCG R: GGGAAGCGTTGACAACAAGC	57	8	0. 8167	0. 7087	0. 6734	0. 152
MFW6	F: ACCTGATCAATCCCTGGCTC R: TTGGGACTTTTAAATCACGTTG	57	10	0. 6500	0. 6716	0. 6536	-0. 032
MFW13	F: ATGATGAGAACATTGTTTACAG R: TGAGAGAACAATGTGGATGAC	55	5	0. 8750	0. 7812	0. 7767	0. 120
MFW14	F: CAGAAGCTTCTGGAAATCTGAG R: GCGAGAAGATTGATGGACAAC	53	11	1. 0000	0. 8989	0. 8729	0. 112
MFW16	F: GTCCATTGTGTCAAGATAGAG R: TCTTCATTTCAGGCTGGAAG	55	10	1. 0000	0. 8893	0. 8614	0. 125
MFW18	F: GTCCCTGGTACTGAGTGAGT R: GCGTTGACTTGTTTTATACTAG	56	4	0. 5750	0. 6117	0. 6061	-0. 060
MFW19	F: GAATCCTCCATCATGCAAAC R: GCACAAACTCCACATTGTGCC	55	5	0. 6875	0. 6937	0. 6826	-0. 009
MFW30	F: GGTCAACAAGTAGTTGTGCAG R: CCATCTCTGTCATTGCAACAG	57	8	0. 6250	0. 6335	0. 6217	-0. 013
HLJ006	F: TCAGTTCCTCAGAAATCCATCG R: GGTCCCATTGACTTCCATA	54	7	0. 7750	0. 7321	0. 7236	0. 059
HLJ010	F: TAGTGGGCACTGCAACTGTC R: CATTCAATTGTCAATTTGAGAAAGG	52	9	0. 8875	0. 6825	0. 6263	0. 300
HLJ011	F: TTAGCCAGCCAGAGACAAGC R: CACTGCCACAAACCCATCTA	56	7	0. 7250	0. 7972	0. 7561	-0. 091
ZF			7. 86	0. 7911	0. 6735	0. 7145	0. 066
HX			8. 37	0. 7928	0. 6792	0. 7192	0. 097
平均值			8. 12	0. 7920	0. 6764	0. 7169	0. 082

注: F – 正向引物; R – 反向引物; A – 平均等位基因数; H_o – 观测杂合度; H_e – 期望杂合度; PIC – 多态信息含量; d – 遗传偏离指数; ZF – 自繁的锦鲤群体; HX – 天津换新良种场的锦鲤群体。
Note: F – Forward; R – Reverse primer; A – number of alleles; H_o – observed heterozygosity; H_e – expected heterozygosity; PIC – polymorphism information contents; d – Hardy – Weinberg equilibrium genetic deviation index. ZF – Ornamental carp population of Artificial Propagation; HX – Ornamental carp population of Tianjin Huanxin High Quality Aquatic Farm.

由图 1 可知,锦鲤群体在微卫星位点 MFW1 有 13 个等位基因,其大小在 100 ~ 300 bp。

式中: n – 等位基因总数; X_i – 第 i 位点的等位基因数; f_i – 位点第 i 个等位基因的频率, $j = i + 1$ 。

2 结果与分析

2.1 微卫星引物的筛选与等位基因组成

在 50 对鲤的微卫星引物中,筛选出重复性好且多态性信息含量丰富的 13 对引物(上海生工生物工程有 限公司合成),用于 2 个锦鲤养殖群体的遗传多样性分析。锦鲤在微卫星位点 MFW1 的电泳图谱如图 1 所示。13 对微卫星位点的统计分析结果如表 1 所示。

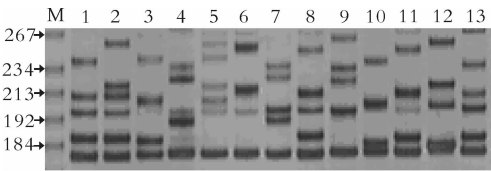
由表 1 可知,在 13 个微卫星位点上共检测出 107 个等位基因,每个位点的等位基因数从 4 ~ 13

个不等,大小在 100 ~ 400 bp。微卫星位点 MFW1 的等位基因数最多,为 13 个;微卫星位点 MFW18 的等位基因数最少,为 4 个。2 个群体的平均等位基因数分别为 7.86 个和 8.37 个。

2.2 微卫星位点的遗传多样性分析

2 个群体的平均多态性信息含量 PIC 分别为 0.7145 和 0.7192,所有微卫星位点都表现出了较高的杂合性和多态性,表明这些位点在锦鲤群体中都具有较高的多态信息含量。

杂合度可以反映出群体在各个位点上的遗传变异,是度量群体遗传变异的一个最适参数, H_o 和 H_e 量化了基因的遗传多样性(马洪雨等,2005)。从表 1 可知,2 个锦鲤养殖群体的平均观测杂合度(H_o)分别为 0.7911 和 0.7928,平均期望杂合度(H_e)分别为 0.6735 和 0.6792。MFW1、MFW14 和 MFW16 位点在群体中的观测杂合度均达到了 1.0000。但 MFW3、MFW6、MFW18、MFW19、MFW30 和 HLJ011 位点的 Hardy – Weinberg 遗传偏离指数(d)为负值。 d 值反映了 H_o 和 H_e 的平衡关系。 d 值越接近 0,表明基因型分布越接近平衡状态。



注:M 为 DNA 分子量标记 pBR322/BsuRI;
1 ~ 13 分别为 13 个锦鲤个体。

图 1 锦鲤在微卫星位点 MFW1 的电泳图谱

Note: M is the pBR322/BsuRI marker;
1 ~ 13 is the individual of Ornamental carp

Fig.1 Electrophoresis of microsatellite locus MFW1 in Ornamental carp

2.3 遗传距离和遗传相似度

根据 Nei M(1978)计算了 2 个锦鲤人工养殖群体间的遗传距离和遗传相似度,群体间遗传距离为 0.1057,遗传相似度为 0.9011。

3 讨论

通过统计分析 2 个锦鲤人工养殖群体中随机采取的各 30 个个体的 13 个微卫星位点的平均等位基因数,计算得到了它们的多态性信息含量,当 $PIC > 0.50$ 时,该位点为高度多态;当 $PIC < 0.25$ 时为低度多态;当 $0.25 < PIC < 0.50$ 时为中度多态。实验结果表明,这 13 个微卫星位点均为高度多态位点。这些微卫星位点适合用来进行锦鲤的遗传多样性研

究(Crooijmans R P M A et al , 1997)。

从实验结果所获得的多态座位和平均杂合度等遗传参数的数值来看,2 个人工养殖群体的多样性水平尚在一个合理状态,但也发现 MFW3、MFW6、MFW18、MFW19 和 MFW30 位点的 Hardy – Weinberg 遗传偏离指数(d)为负值,这可视作杂合子缺失,即实际纯合子过量,由此看来,该养殖群体的遗传多样性现状也不能过于乐观。为保证锦鲤养殖产业持续、健康、稳定的发展,需要重视亲鱼的种质控制,加强种质资源的跟踪检测,维持育苗亲本的适当大小,定期更换亲鱼,采取科学的选种育种方法。可以将传统的遗传育种技术与现代生物技术相结合,培育优质、健康、抗逆性强的新品种。

本研究中,2 个人工养殖群体的平均观测杂合度值在 0.7911 和 0.7928,平均期望杂合度值在 0.6735 和 0.6792,表现出了较高的遗传变异水平(Istvan L et al , 2005)。

遗传相似性指数和遗传距离是衡量群体间亲缘关系的重要的指标。一级亲缘关系的个体间遗传相似指数为 0.50,二级亲缘关系为 0.25。研究结果表明,2 个人工养殖的锦鲤群体间的亲缘关系较近,遗传距离较小。

参考文献:

林凯东,罗琛. 2003. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析的适用性的初步研究[J]. 激光生物学报,12(2):121 – 127.

马洪雨,江运良,岳永生. 2005. 一种从鱼类肌肉组织中提取基因组 DNA 的简易方法[J]. 生物技术通讯,16(5):531 – 532.

BANKS M A, RASHBROOK V K, cALAVETTA M J, et al. 2000. Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in California’s Central Valley [J]. Can J Fish Aquat Sci,57(5):915 – 927.

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

Desvignes J F, Laroche J, Durand J D, et al. 2001. Genetic variability in reared stocks of common Carp(*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites [J]. Aquaculture, 194:291 – 301.

Dietrich W, Katz H, Linclon S E. 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses [J]. Genetics, 131:423 – 447.

Istvan L, Istvan M, Csaba H, et al. 2005. Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers [J]. Hydrobiolo-

- gia, 533;223 – 228.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 89;583 – 590.
- Rana R S, Bhat K V, Lakhanpal S, et al. 2004. Comparative genetic diversity in natural and hatchery populations of Indian major carp(*C catla* and *L rohita*) [J]. Asian – Aust J Anim Sci, 17(9):1 197 – 1 203.
- Roques S, Sevigny J M, Bernatchez,2002. Genetic structure of deep – water redfish, *Sebastes mentella*, populations across the North Atlantic[J]. Marine Biology, 140;297 – 307.
- Zhou J, Wu Q, Wang Z, et al. 2004. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L) in china using microsatellite markers[J]. Russian journal of genetics, 40(10):1 144 – 1 148.

(责任编辑 万月华)

Microsatellite Marker Analysis of Genetic Diversity in the Two Artificial Breed Population of *Ornamental carp*

CHEN Wan-guang¹, WANG Hui²

(1. Department of Life Science, Luoyang Normal College, Luoyang Henan 471022, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian Shandong 271018, China)

Abstract: The genetic diversity of the artificial breed *Ornamental carp* population were studied by using 13 microsatellite primers. The results showed that the genetic diversity level of *Ornamental carp* population was high. The average number of allele(A) ranged from 7.86 to 8.37; The average heterozygosity(H_o) in two populations was from 0.7911 to 0.7928; average expected heterozygosity(H_e) was from 0.6735 to 0.6792; and average polymorphism information content(PIC) was from 0.7145 to 0.7192. The genetic distance was 0.1057 and genetic identity was 0.9011. Thirteen microsatellite loci could be used for genetic analysis.

Key words: *Ornamental carp*; microsatellite markers; genetic diversity