

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00192

## 草鱼野生群体遗传变异的微卫星分析

傅建军<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1</sup>, 沈玉帮<sup>1</sup>, 王荣泉<sup>2</sup>, 宣云峰<sup>2</sup>, 徐晓雁<sup>1</sup>, 陈勇<sup>1</sup>

1. 上海海洋大学, 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 江苏吴江国家级四大家鱼原种场, 吴江 215221

**摘要:** 利用 12 个微卫星标记, 对来自长江水系(邗江、吴江、九江、石首、木洞和万州)、珠江水系(肇庆)和黑龙江水系(嫩江)的 8 个草鱼野生地理群体进行了遗传多样性及遗传结构等分析。遗传多样性分析显示, 12 个微卫星位点均为高度多态位点 ( $PIC=0.755\sim 0.930$ ), 8 个草鱼野生群体显示出较高的遗传多样性水平 ( $H_o=0.839\sim 0.893$ ), 其中长江水系的 6 个群体和肇庆群体的多样性水平高于嫩江群体。瓶颈效应分析显示, 嫩江、肇庆群体及 2 个长江上游群体(木洞、万州)近期出现了瓶颈效应, 群体数量发生下降。群体间遗传分化指数  $F_{ST}$  及 AMOVA 分析显示, 群体间出现极显著遗传分化 ( $P<0.01$ ), 整体分化水平较低 ( $F_{ST}<0.05$ )。遗传距离分析结果显示, 长江水系的 6 个群体与肇庆群体遗传距离较近, 与嫩江群体较远; 基于此的 UPGMA 聚类树显示, 长江水系下游、中游和上游的群体依次聚类, 然后与肇庆群体聚类, 最后与嫩江群体聚类, 遗传距离与地理距离呈现出较强的正相关性。遗传结构分析显示, 所有样本被划分为 5 个理论群, 肇庆和嫩江群体中个体的遗传结构相对独立, 而长江上游、中游和下游群体中个体的遗传结构则存在一定程度的混杂。综上所述, 中国草鱼野生资源具有较高的遗传多样性, 地理群体间存在遗传分化, 具有进一步遗传改良的潜力; 但部分群体出现的瓶颈效应也需要引起重视。

**关键词:** 草鱼; 野生群体; 遗传多样性; 瓶颈效应; 遗传结构

## Genetic variation analysis of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers

FU Jian-Jun<sup>1</sup>, LI Jia-Le<sup>1</sup>, SHEN Yu-Bang<sup>1</sup>, WANG Rong-Quan<sup>2</sup>, XUAN Yun-Feng<sup>2</sup>, XU Xiao-Yan<sup>1</sup>, CHEN Yong<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Wujiang National Farm of Four Major Domesticated Chinese Carps, Wujiang 215221, China

**Abstract:** Twelve microsatellites were used to analyze the genetic diversity and genetic structure of eight wild populations of grass carp, among which six populations from Yangtze River (Hanjiang, Wujian, Jiujiang, Shishou, Mudong, and

收稿日期: 2012-09-25; 修回日期: 2012-12-18

基金项目: 现代农业产业技术体系建设项目(编号: CARS-46-04), 国家科技支撑计划项目(大宗淡水主养鱼类新品种选育)(编号: 2012BAD26B02)和上海市重点学科建设项目(编号: Y1101)资助

作者简介: 傅建军, 博士研究生; 研究方向: 水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: fjj5d20@163.com

通讯作者: 李家乐, 教授, 博士生导师; 研究方向: 水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: jlli2009@126.com

网络出版时间: 2012-12-24 14:22:41

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121224.1422.004.html>

Wanzhou), one population from Pearl River and Heilongjiang River for each, Zhaoqing, and Nenjiang, respectively. Twelve markers showed highly polymorphic and all the eight populations contained high genetic variations. The variations of six populations of Yangtze River and Zhaoqing population of Pearl River were higher than Nenjiang population of Heilongjiang River. Bottleneck analysis revealed that four populations (Zhaoqing, Nenjiang, Mudong, and Wangzhou) had experienced a recent genetic bottleneck, and the effective population size was reduced. Pairwise  $F_{ST}$  and AMOVA analysis detected significant genetic difference among populations. The pairwise population genetic distances and the UPGMA tree demonstrated that the genetic distances between six populations of Yangtze River and Zhaoqing population were closer and clustered together earlier, as compared to those populations with Nenjiang population. The genetic structure simulation analysis suggested that there were five logic populations of all individuals. The genetic structures of Zhaoqing and Nenjiang populations were shown with independent separation, but the genetic structures of populations from Yangtze River were shown with fuzzy distribution. The high diversity was found in the wild grass carp from three major watersheds in China, which would supply a basis for future genetic improvement. However, the bottleneck effect of some populations should be taken into account in the practical breeding programs.

**Keywords:** *Ctenopharyngodon idella*; wild population; genetic diversity; bottleneck effect; genetic structure

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国的土著鱼类,广泛分布于长江、珠江及黑龙江水系等水域中<sup>[1]</sup>,为我国重要的淡水鱼类资源之一。草鱼在我国具有悠久的养殖历史,也是目前世界上养殖产量最大的淡水鱼类<sup>[2]</sup>,具有非常高的经济价值。草鱼的生物资源一度非常丰富,然而当前草鱼资源的可持续利用正面临严峻的挑战。由于长期受到生境破坏、过度捕捞及水体污染等影响,草鱼的野生资源锐减<sup>[3-5]</sup>,而且草鱼养殖业缺乏科学管理,存在种质衰退风险<sup>[6,7]</sup>。良种培育可以减少对草鱼野生资源的依赖,并能有效控制和避免种质衰退,是实现对草鱼资源可持续利用和发展的有效途径。

了解和掌握草鱼野生资源的遗传多样性及遗传结构,是评价草鱼种质资源的依据,有助于制定合理的育种方案并进行科学的遗传改良及育种。分子标记作为鱼类群体多样性研究的有效手段<sup>[8]</sup>,在草鱼研究中得到广泛应用<sup>[2,7]</sup>。到目前为止,一些学者应用RAPD<sup>[9]</sup>、RFLP<sup>[10]</sup>、TRAP<sup>[11]</sup>、ISSR<sup>[12]</sup>及SSR<sup>[13-15]</sup>等手段对国内外草鱼群体的遗传多样性进行了研究。但由于检测手段和研究群体的不同,研究结果也不尽相同,因此有进一步开展草鱼群体多样性研究的必要性。鉴于此,本研究选用多态性高的微卫星标记,通过全自动DNA测序仪分析技术针对长江、珠江及黑龙江水系的 8 个草鱼野生群体的遗传多样性及遗传结构进行分析,以补充和完善对草鱼

种质资源的研究,并为目前课题组开展草鱼遗传育种工作提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料及 DNA 提取

本研究 8 个草鱼野生群体为 2008~2010 年收集于长江、珠江及黑龙江水系(表 1),活体培育于江苏吴江国家级四大家鱼原种场,并被用作选育亲本。实验样本为剪取的鳍条组织并以无水乙醇固定,于 4℃ 保存。本研究采用苯酚/氯仿法提取基因组 DNA,通过 1%的琼脂糖胶检测其完整性,经 NanoDrop 2000C 分光光度计检测其纯度及浓度,并将 DNA 样品稀成 20 ng/μL 的终浓度,于 -20℃ 保存备用。

### 1.2 微卫星 PCR 扩增及分型

本研究所采用微卫星标记来自于草鱼遗传连锁

表 1 草鱼样本采集信息

群体	采样地	经纬度	样本数
邗江 HJ	江苏邗江	+119.43, +32.35	41
吴江 WJ	江苏吴江	+120.53, +31.06	49
九江 JJ	江西九江	+115.96, +29.72	45
石首 SS	湖北石首	+112.39, +29.74	11
木洞 MD	重庆木洞	+106.85, +29.57	24
万州 WZ	重庆万州	+108.45, +30.83	48
肇庆 ZQ	广东肇庆	+112.53, +23.08	59
嫩江 NJ	黑龙江嫩江	+125.22, +49.21	48

图谱<sup>[16]</sup>及新开发的标记, 微卫星标记开发方法同Li等<sup>[17]</sup>。引物由上海生工生物技术服务公司合成, 上游引物 5'端加上FAM或HEX荧光标记(表 2)。

PCR扩增体系为 25  $\mu$ L, 包括 10 $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)1.5  $\mu$ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L、*Taq*DNA聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L、上游及下游引物(10 mmol/L)各 0.5  $\mu$ L、基因组DNA(20 ng/ $\mu$ L)1  $\mu$ L, 补充无菌水 16.5  $\mu$ L。所需试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR扩增程序为: 94 预变性 2 min; 94 变性 30 s, 55~58 (表 2)复性 30 s, 72 延伸 40 s, 扩增 35 个循环; 最后再 72 延伸 10 min, 4 保温。扩增反应在Eppendorf梯度PCR仪上完成。反应产物通过ABI3730XL全自动DNA 测序仪分析, 以ROX-500 为分子量内标, 通过Genemapper Version 3.5 软件读取微卫星扩增产物的分子量数据(图 1)。

表 2 草鱼 12 个微卫星引物序列

位点	引物序列(5'→3')	复性温度( )	重复序列	长度范围(bp)
<i>CID0001</i>	F: HEX-GTGTGCTGGATAATGGGA R: TGGTGAAGCAAGAGGTGTG	57.0	(AC) <sub>16</sub>	197~271
<i>CID0002</i>	F: FAM-GCAGGCTGCTGAAGAATA R: AACTTACTGACCCCAAACC	56.0	(AC) <sub>23</sub>	244~314
<i>CID0004</i>	F: HEX-ATCCCCTCTCAATTGACTCACAGTT R: GCTGGCATCTATTTTGAATTCTTATTG	55.0	(TG) <sub>18</sub>	144~214
<i>CID0012</i>	F: FAM-ACAGTGCTAAACCTGCCAGTCAGTG R: ACAGCAGCACCAGTGGACATCAT	55.0	(TG) <sub>15</sub>	124~198
<i>CID0017</i>	F: FAM-CTGGCCCCGGAGGAGACG R: AGCAGCGACCGCAGAAGATGAT	58.0	(CA) <sub>20</sub>	318~368
<i>CID0036</i>	F: FAM-CCAGGGGCAAAAACAGACAATACTC R: AGGAAGCCATTCTTTGGATCTCATTAG	57.0	(CA) <sub>18</sub>	101~149
<i>CID0044</i>	F: HEX-TTGTGGTGGATCGCCTGTATTT R: GAGCTGCCCAAGCGTGTGC	55.0	(GT) <sub>16</sub>	358~414
<i>CID0058</i>	F: HEX-AAGGGAGAGGGAGAAGGAAGAGA R: AGGCGGAGGAGTGAAACGAA	56.0	(TG) <sub>21</sub>	136~200
<i>CID0909</i>	F: HEX-CATGTAGTCCACCGCCTGATGAT R: GAAGGGGACGCTTGAATCCA	55.0	(CA) <sub>13</sub>	308~352
<i>CID1525</i>	F: FAM-AAGAGCCCACTTACGTGACTGT R: GTTTTTCCCTTTAACCCGCTCTCT	55.0	(GA) <sub>26</sub>	225~267
<i>CID1528</i>	F: HEX-GCTGGTTTAAACAGGCACACCTTC R: TTGGGACGGAAAGCTGCTCTG	55.0	(CT) <sub>18</sub>	323~359
<i>CID1529</i>	F: FAM-AGGGGTTTGGGATGACACAG R: TAACAGGCTTGTAACATCCAATG	55.0	(GA) <sub>31</sub>	391~455

### 1.3 数据统计与分析

根据分子量数据确定个体各位点基因型, 用POPGEN3.2<sup>[18]</sup>计算等位基因数( $N_a$ ), 有效等位基因数( $N_e$ ), Shannon多样性指数(Shannon's information index,  $I$ ), 观测杂合度( $H_o$ ), 期望杂合度( $H_e$ ); 用CERVUS 3.0<sup>[19]</sup>计算多态信息含量( $PIC$ ), 并采用马尔科夫链(Markov Chain)方法进行Hardy-Weinberg平衡检验。

利用ARLEQUIN 3.5<sup>[20]</sup>计算群体遗传分化的 $F$ -统计量( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ )及分子方差分析(AMOVA), 利用POPGEN 3.2 计算群体间的Nei's遗传距离, 并基于该遗传距离用MEGA 5.0<sup>[21]</sup>作UPGMA系统树。其中两地理坐标间直线距离计算方法参照韩忠民<sup>[22]</sup>, 并根据遗传距离及地理距离数据在Excel中作线性相关图(图 2)。

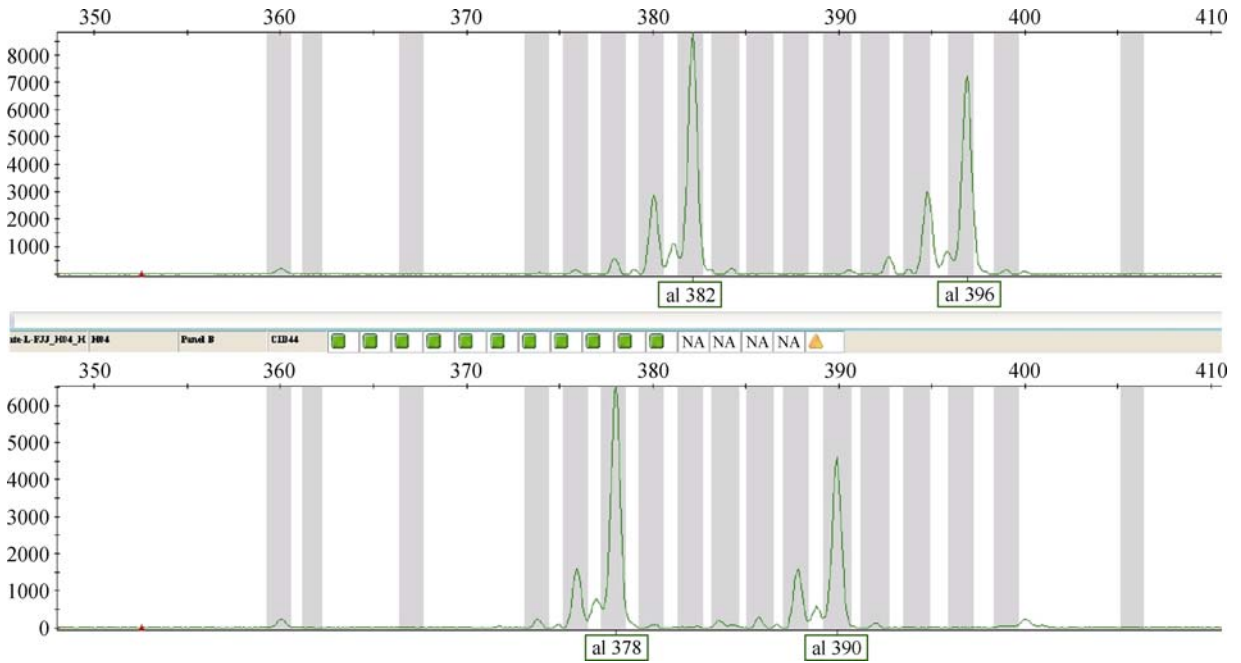


图 1 位点 *CID0044* 的分型图

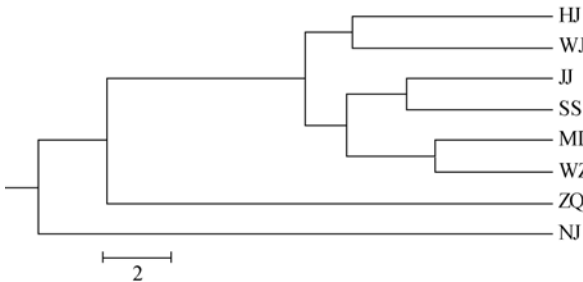


图 2 基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类树

根据各位点等位基因频率, 用BOTTLENECK 3.4<sup>[23]</sup>进行瓶颈效应分析, 基于无限等位基因模型 (Infinite allele model, IAM)、双相突变模型 (Two-phased model of mutation, TPM)及逐步突变模型 (Step-wise mutation model, SMM)计算平均期望杂合度 (Expected average heterozygosity,  $H_{EQ}$ ), 重复 1 000 次, 采用符号检验 (Sign test)和Wilcoxon符号秩次检验 (Wilcoxon sign-rank test)分析杂合过度是否显著, 通过分析群体突变-漂移平衡来估计群体数量动态变化。利用STRUCTURE 2.3<sup>[24]</sup>进行群体遗传结构分析, 分析最佳*K*值, 即为群体遗传结构的理论群体数。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星位点的多态性及群体的遗传多样性

本文共研究了 12 个位点, 其中 8 个为新开发的

微卫星标记(*CID0001*、*CID0002*、*CID0004*、*CID0012*、*CID0017*、*CID0036*、*CID0044* 和 *CID0058*), 4 个来自于草鱼遗传连锁图谱(*CID0909*、*CID1525*、*CID1528* 和 *CID1529*)。12 对微卫星引物在 8 个野生群体中的扩增结果如表 3 所示, 等位基因数( $N_a$ )介于 19~34 个之间, 有效等位基因数( $N_e$ )介于 4.44~15.24 之间, 观测杂合度( $H_o$ )介于 0.748~0.939 之间, 期望杂合度 ( $H_e$ )介于 0.776~0.936 之间; 多态信息含量( $PIC$ )介于 0.755~0.930 之间, 均属于高度多态性位点( $PIC>0.5$ ); 其中 1 个位点(*CID0909*)极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P<0.01$ )。

8 个草鱼野生群体的遗传多样性如表 4 所示, 万州群体的平均等位基因数最多( $N_a=16.92$ ), 嫩江群体最少( $N_a=11.42$ ); 万州群体的平均有效等位基因数最多( $N_e=8.95$ ), 嫩江群体最少( $N_e=6.12$ ); 吴江群体的 Shannon 多样性指数最高( $I=2.414$ ), 嫩江群体的最低( $I=1.993$ ); 九江群体的平均观测杂合度最高 ( $H_o=0.893$ ), 万州群体最低( $H_o=0.839$ ); 万州群体的平均期望杂合度最高( $H_e=0.885$ ), 嫩江群体的最低 ( $H_e=0.831$ ); 万州群体的多态信息含量最高( $PIC=0.864$ ), 嫩江群体的最低( $PIC=0.802$ )。总体上, 8 个群体均具有较高的遗传多样性, 其中长江水系的 6 个群体和肇庆群体的多样性水平没有明显差异, 并高于嫩江群体。

表 3 草鱼 12 个微卫星位点的等位基因数、等位基因丰富度、杂合度及多态信息含量

位点	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( $H_e$ )	多态信息含量( $PIC$ )
CID0001	28	4.44	0.761	0.776	0.755
CID0002	30	15.01	0.920	0.935	0.930
CID0004	26	10.73	0.899	0.908	0.900
CID0012	31	6.94	0.810	0.857	0.846
CID0017	19	8.41	0.859	0.883	0.874
CID0036	26	11.22	0.939	0.912	0.904
CID0044	22	7.13	0.748	0.861	0.851
CID0058	26	11.75	0.922	0.916	0.909
CID0909	20	11.82	0.872**	0.917	0.909
CID1525	21	9.03	0.879	0.891	0.879
CID1528	20	6.06	0.850	0.836	0.812
CID1529	34	15.24	0.910	0.936	0.930
均值	25.25	9.82	0.864	0.886	0.875

注：\*\*表示极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.01$ )。

表 4 草鱼 8 个群体的遗传多样性

参数	邗江	吴江	九江	石首	木洞	万州	肇庆	嫩江
$N_a$	15.50	17.33	16.33	10.42	13.25	16.92	18.25	11.42
$N_e$	8.24	8.78	8.13	7.24	7.89	8.95	8.83	6.12
$I$	2.321	2.414	2.335	2.101	2.224	2.401	2.413	1.993
$H_o$	0.884	0.878	0.893	0.886	0.869	0.839	0.844	0.847
$H_e$	0.875	0.882	0.870	0.878	0.874	0.885	0.882	0.831
$PIC$	0.845	0.862	0.850	0.822	0.841	0.864	0.863	0.802

## 2.2 瓶颈效应分析

8 个草鱼野生群体在 IAM、TPM 和 SMM 3 种突变模型假设下的平均期望杂合度( $H_{EQ}$ )如表 5 所示, 12 个位点中, 在 IAM 假设下除 CID0001 和 CID0012 位点外其他位点  $H_E$  均高于  $H_{EQ}$ , 且在 CID0004、CID0017、CID0036、CID0058、CID1525、CID1528 和 CID1529 位点差异显著( $P < 0.05$ ), 在 CID0002、CID0909 位点差异极显著( $P < 0.01$ ); 在 TPM 假设下, 有 4 个位点的  $H_E$  低于  $H_{EQ}$ , 其余位点  $H_E$  高于  $H_{EQ}$ , 且在 CID0909 位点差异显著( $P < 0.05$ ), 在 CID0001、CID0012 位点差异极显著( $P < 0.01$ ); 在 SMM 假设下, 除了 CID0909 位点外其他位点  $H_E$  均低于  $H_{EQ}$ , 且在 CID0004、CID0036 和 CID1525 位点差异显著( $P < 0.05$ ), 在 CID0001、CID0012、CID0044 和 CID1528 位点差异极显著( $P < 0.01$ )。

符号检验和 Wilcoxon 符号秩次检验的结果如表 6 所示, IAM 模型下, 所有群体均表现出杂合过度,

符号检验中除了嫩江群体显著偏离突变-飘移平衡外, 其他群体都不显著偏离突变-飘移平衡, Wilcoxon 符号秩次检验中木洞和万州群体显著偏离突变-飘移平衡, 肇庆和嫩江群体极显著偏离突变-飘移平衡, 其余的群体都不显著偏离突变-飘移平衡; TPM 模型下九江和肇庆群体表现出一定程度的杂合不足, 其余群体表现杂合过度, 且只有嫩江群体在 Wilcoxon 符号秩次检验中显示显著偏离突变-飘移平衡; SMM 模型下只有石首群体表现杂合过度, 其余群体均表现出杂合不足, 在符号检验中除了邗江、石首和木洞群体外, 其他群体均表现显著或极显著偏离突变-飘移平衡, 在 Wilcoxon 符号秩次检验中除了邗江、石首、木洞和万州群体外, 其余群体均表现极显著偏离突变-飘移平衡。

## 2.3 群体间遗传分化及遗传距离分析

群体间遗传分化如表 7 所示, 九江和石首群体、万州和木洞群体间的遗传分化指数( $F_{ST}$ )为负值, 说

表 5 草鱼微卫星位点瓶颈效应分析

位点	$H_E$	IAM 模型			TPM 模型			SMM 模型		
		$H_{EQ}$	DH/sd	$P$	$H_{EQ}$	DH/sd	$P$	$H_{EQ}$	DH/sd	$P$
CID0001	0.776	0.857	-1.593	0.079	0.916	-7.946	0.001**	0.940	-10.467	0.003**
CID0002	0.935	0.866	1.431	0.001**	0.922	0.826	0.235	0.943	-0.369	0.161
CID0004	0.908	0.844	1.077	0.049*	0.907	0.064	0.451	0.934	-0.962	0.026*
CID0012	0.857	0.874	-0.429	0.261	0.926	-4.366	0.003**	0.945	-4.317	0.006**
CID0017	0.882	0.788	1.163	0.046*	0.868	0.437	0.405	0.911	-1.588	0.059
CID0036	0.912	0.849	1.239	0.037*	0.908	0.202	0.521	0.935	-1.089	0.047*
CID0044	0.861	0.816	0.622	0.272	0.887	-0.937	0.156	0.922	-2.335	0.008**
CID0058	0.916	0.844	1.275	0.025*	0.907	0.437	0.413	0.935	-1.296	0.066
CID0909	0.917	0.800	1.462	0.000**	0.876	1.331	0.032*	0.915	0.102	0.489
CID1525	0.891	0.804	1.211	0.033*	0.884	0.257	0.497	0.920	-2.131	0.040*
CID1528	0.836	0.798	0.517	0.352*	0.876	-1.310	0.099	0.915	-3.968	0.002**
CID1529	0.936	0.886	1.340	0.014*	0.934	0.163	0.531	0.948	-0.479	0.077

注: DH/sd表示 $H_E$ 与 $H_{EQ}$ 的差与标准偏差之比; \*表示 $H_E$ 与 $H_{EQ}$ 差异显著( $P<0.05$ ); \*\*表示 $H_E$ 与 $H_{EQ}$ 差异极显著( $P<0.01$ )。

表 6 草鱼群体突变-漂移平衡分析

群体	符号检验						Wilcoxon 符号秩次检验		
	IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
	$H_E/H_D$	$P$	$H_E/H_D$	$P$	$H_E/H_D$	$P$	$P$	$P$	$P$
邗江	9/3	0.247	7/5	0.586	4/8	0.071	0.077	0.791	0.064
吴江	10/2	0.098	7/5	0.590	2/10	0.004**	0.151	0.910	0.002**
九江	10/2	0.093	5/7	0.177	1/11	0.000**	0.151	0.622	0.003**
石首	8/4	0.469	7/5	0.510	6/1	0.314	0.233	0.970	0.380
木洞	10/2	0.093	9/3	0.230	4/8	0.066	0.013*	0.424	0.052
万州	10/2	0.094	6/6	0.318	3/9	0.017*	0.043*	0.425	0.979
肇庆	10/2	0.089	5/7	0.174	1/11	0.000**	0.006**	0.715	0.001**
嫩江	11/1	0.022*	10/2	0.080	1/11	0.001**	0.001**	0.043*	0.002**
合计	10/2	0.095	8/4	0.396	1/11	0.000**	0.043*	0.970	0.001**

注:  $H_E/H_D$ 表示杂合度过度与不足位点数之比; \*表示显著偏离平衡( $P<0.05$ ); \*\*表示极显著偏离平衡( $P<0.01$ )。

表 7 草鱼群体间Nei's遗传距离( $D_A$ , 对角线以下)及 $F_{ST}$ 统计值( $F_{ST}$ , 对角线以上)

	邗江	吴江	九江	石首	木洞	万州	肇庆	嫩江
邗江		0.0118**	0.0169**	0.0154**	0.0149**	0.0152**	0.0231**	0.0411**
吴江	0.1130		0.0109**	0.0068*	0.0094**	0.0101**	0.0186**	0.0341**
九江	0.1409	0.1038		-0.0032	0.0084**	0.0090**	0.0181**	0.0378**
石首	0.1948	0.1475	0.0807		0.0012	0.0038	0.0119*	0.0299**
木洞	0.1650	0.1339	0.1057	0.1274		-0.0001	0.0030	0.0395**
万州	0.1512	0.1056	0.0976	0.1393	0.0675		0.0030	0.0351**
肇庆	0.2859	0.2654	0.2484	0.2905	0.1536	0.1390		0.0356**
嫩江	0.3041	0.2480	0.2839	0.3106	0.3166	0.2728	0.3493	

注: \* 表示分化达到显著水平( $P<0.05$ ); \*\*表示分化达到极显著水平( $P<0.01$ )。

明两对群体间无遗传分化, 其余群体间的遗传分化指数介于0.0012~0.0411之间, 属于轻微程度的分化( $F_{ST}<0.05$ )<sup>[25]</sup>; 其中石首与木洞、万州群体间, 肇庆

与万州、木洞群体间的遗传分化不显著( $P>0.05$ ), 其余群体间的遗传分化显著或极显著。AMOVA分析如表 8 所示, 1.91%遗传变异来自群体间的遗传分化,

表 8 草鱼群体的微卫星分子方差分析结果

变异来源	自由度	平方和	方差组分	百分率(%)
群体间	7	92.482	0.10052 **	1.91
群体内个体间	318	1644.670	0.01311	0.25
个体内	326	1677.500	5.14571**	97.84
总变异	651	3414.652	5.25933	

注: \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

达到极显著水平( $P < 0.01$ )。

群体间遗传距离如表 7 所示, 木洞和万州群体间遗传距离最小( $D_A = 0.0675$ ), 嫩江和肇庆群体间遗传距离最大( $D_A = 0.3493$ )。基于群体间遗传距离( $D_A$ )构建的UPGMA聚类树(图 2)显示, 长江上游的两个群体(木洞、万州)首先聚类, 并依次与长江中游两个群体(九江、石首)和长江下游两个群体(吴江、邗江)聚类, 然后与肇庆群体聚类, 最后与嫩江群体聚类。

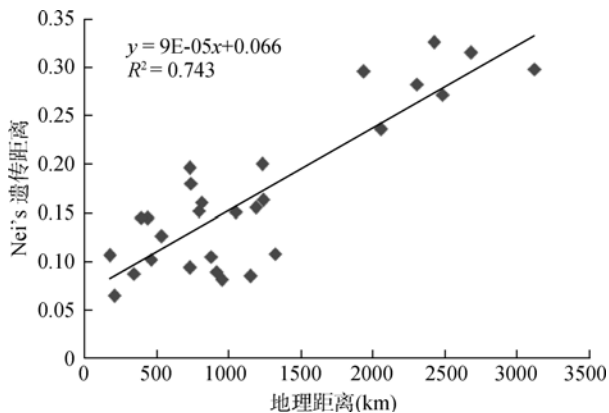


图 3 群体间 Nei's 遗传距离和地理距离的散点图

群体间的遗传距离与地理距离进行相关性分析如图 3 所示, 两者呈现较强的正相关性( $R = 0.862$   $P < 0.01$ )。

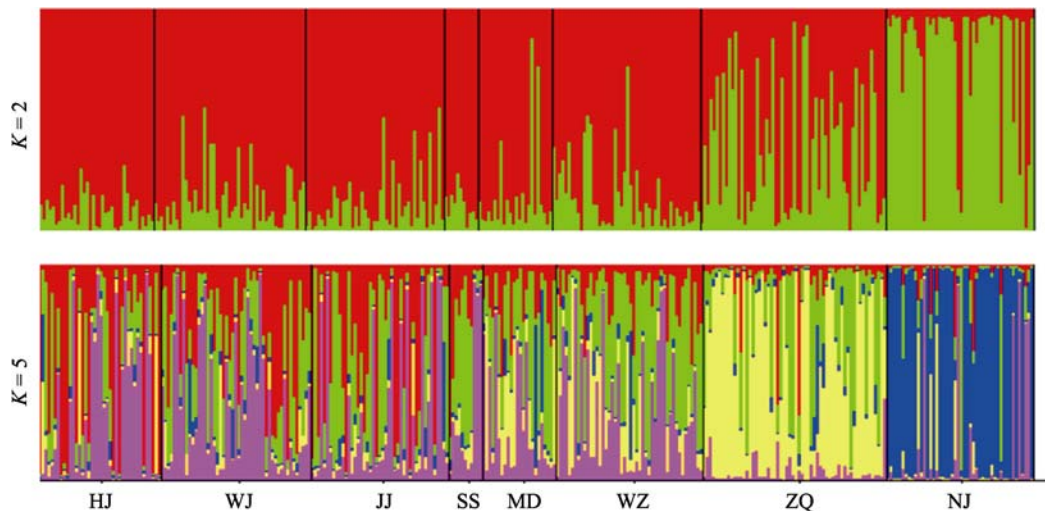
## 2.4 群体遗传结构分析

本研究执行 2~8 的假设  $K$  值, 设 10 次重复, 根据  $K$  值对应参数的趋势分析, 发现  $K=5$  时出现明显折点, 推断本研究所有参试个体最佳分组为 5 个理论群。图 4 给出了最小分组  $K=2$  及最佳假设  $K=5$  的遗传结构对照图。由图可知, 长江、珠江和黑龙江水系的个体划分明显; 嫩江、肇庆群体的个体遗传结构相对独立, 而来源长江水系不同江段的个体间存在一定程度的混杂。

## 3 讨论

### 3.1 微卫星多态性分析

微卫星标记遵循孟德尔遗传规律, 呈共显性遗传、多态性高及易于操作等特点受到研究中的青睐, 被广泛应用于鱼类种质资源及遗传育种研究<sup>[26~28]</sup>。本研究所用的 12 个微卫星位点的多态信息含量( $PIC$ )介于 0.755~0.930 之间, 根据Botstein等<sup>[29]</sup>提出的标

图 4 参试草鱼群体的在不同假设  $K$  值下的遗传结构图

准, 均属于高度多态性位点, 除 1 个位点外均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 可见这些位点能提供丰富遗传信息, 能有效地用于草鱼群体的遗传多样性及遗传结构分析。

本研究各微卫星位点表现出高度多态性, 平均等位基因数( $N_a$ )为 25.25 个, 与Liu等<sup>[13]</sup>的研究结果相似, 其平均等位基因数为 21.2 个, 高于其他基于微卫星标记的草鱼群体多样性相关研究报道。Zheng等<sup>[30]</sup>、王解香等<sup>[14]</sup>和周盼<sup>[15]</sup>等利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术获得的平均等位基因数分别为 2.63、4.89 和 6.92 个。同种标记在不同研究中其多态性研究结果存在的较大差异, 与采用的研究样本及检测技术不同有关; 即使相同微卫星位点在利用不同检测技术的研究中也会表现出较大的差异。傅建军等<sup>[31]</sup>利用 8 对微卫星标记在草鱼杂交遗传分析中采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术检测结果发现等位基因数为 2~6 个, 而Li等<sup>[17]</sup>在开发标记时利用测序仪分型技术检测结果发现该 8 对标记对应的等位基因数为 7~12 个。相比基因分型技术, 聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率相对较低, 是造成等位基因数缺失的原因。

### 3.2 群体多样性分析

从整体水平看, 本研究的 8 个草鱼野生群体呈现较高的多样性水平, 表现出良好的种质状况, 具有进一步选育的价值和潜力。本研究结果与Liu等<sup>[13]</sup>和周盼等<sup>[15]</sup>的研究发现相符, 各野生群体的杂合度均较高, 支持我国野生草鱼资源具有较高的多样性水平。廖小林等<sup>[32]</sup>及王解香等<sup>[14]</sup>对长江水系及珠江水系的草鱼群体微卫星分析结果有所不同, 显示各群体的杂合度并不高。分析不同的研究结果, 与选用的微卫星标记及检测手段不同有关。本研究发现, 长江水系的 6 个群体和珠江水系的肇庆群体的遗传多样性水平差异不大, 普遍高于黑龙江水系的嫩江群体, 支持李思发等<sup>[33]</sup>利用形态学手段的研究结果, 推断黑龙江群体属自然分布区的边缘群体, 嫩江群体位于黑龙江水系最大支流松花江的北源, 与属于中央群体的长江、珠江水系的群体存在较大差异。遗传多样性表现出的地理水平差异也跟草鱼对不同环境的适应能力有关, 水域环境越适宜, 生物量和遗传多样性越丰富。相比地处高纬度气候寒冷、水草欠丰的黑龙江水系, 长江和珠江水系气候适宜,

沿江具有许多水草茂盛的湖泊可供生长育肥, 更利于草鱼的生长繁衍。

### 3.3 群体瓶颈效应分析

处于突变-漂移平衡的群体, 其基因位点出现杂合度过剩及不足的概率大致均等<sup>[34]</sup>; 一旦发生瓶颈效应, 就会造成杂合度过剩的现象<sup>[35]</sup>。因此杂合度过剩被用于衡量群体数量下降的瞬间效应。IAM模型和SMM模型是两种基于不同突变-漂移假设的极端模型, 而TPM模型则是对以上两者的综合模型。SMM模型适用于遗传标记逐步变化的较大群体的长期动态分析, 对群体瞬间变化的估计能力有限<sup>[34]</sup>。本研究选用的微卫星位点具有高杂合度、短重复单元(2 碱基)等特点, 用于分析群体近期发展趋势, 因此采用IAM模型及TPM的假设分析更加合适。在IAM及TPM模型下, 采用符号检验及Wilcoxon符号秩次检验发现, 木洞、万州、肇庆及嫩江 4 个群体显示出显著或极显著杂合过剩。说明以上 4 个群体近期经历了不同程度的瓶颈效应, 群体数量发生不同程度的下降, 其中以嫩江群体尤为严重。瓶颈效应的发生与生境破坏和环境恶化有关, 如水利设施的修建及水体污染等因素<sup>[3-5]</sup>。嫩江群体由于所处高纬度水域冰期长不利于污染的自净, 加之种群繁衍缓慢、数量有限使其更易受到影响。

### 3.4 群体间遗传变异分析

本研究为了降低部分群体样本数较少的的影响, 通过采用高度多态性位点, 降低遗传参数的变异系数, 在个体数较少的情况下也能获得可信的遗传评估<sup>[36, 37]</sup>。遗传分化指数( $F_{ST}$ )值是衡量群体间遗传分化程度的重要参数。本研究 8 个群体间遗传分化指数值较小, 揭示整体水平的遗传分化程度较低, 而来源于不同水系的群体间大多表现出显著的遗传分化。遗传分化水平与薛国雄等<sup>[9]</sup>、王解香等<sup>[14]</sup>和周盼等<sup>[15]</sup>的研究结果基本一致。根据遗传分化与基因交流的相关性<sup>[38]</sup>, 推测在地理分布上表现出的差异与群体间基因交流水平有关。嫩江群体与其他 7 个群体表现出极显著的分化, 归因于黑龙江水系种群相对独立的边缘分布造成自然地理隔离<sup>[1]</sup>, 发生基因交流的可能性较小。

群体间Nei's遗传距离和依此构建UPGMA树显



示,肇庆群体、嫩江群体与长江水系 6 个群体间的分化较长江水系内 6 个群体间的遗传分化更明显,遗传距离与地理距离呈现较强相关性。研究发现长江上游、中游及下游内的群体间遗传距离很近,长江水系的 6 个群体与肇庆群体间遗传距离居中,嫩江群体与长江水系的 6 个群体及肇庆群体间的遗传距离较远,与其他研究者利用形态学<sup>[33]</sup>、RAPD 标记<sup>[9]</sup>及微卫星标记<sup>[15]</sup>等获得的研究结果相符。

STRUCTURE 软件基于个体的遗传组成进行群体模拟分析,不受各群体的样本数的影响,是用于群体遗传结构分析的理想工具<sup>[39]</sup>。本研究所有参试个体被划分为 5 个理论群,支持 UPGMA 树的聚类结果,而遗传结构图的直观显示结果与遗传分化分析结果相吻合。长江水系的所有个体的遗传结构相对复杂,上游、中游及下游的个体遗传结构区分不甚明显。一方面可能由于草鱼具有较强的迁徙和适应能力,导致群体混杂现象;另外人工增殖放流也可能加大了基因交流的水平。而肇庆、嫩江群体中个体的遗传结构相对单一,这可能由于独立的水系分布阻碍了自然条件下的基因交流。

#### 参考文献(References):

- [1] 李思忠, 方芳. 鲢、鳙、青、草鱼地理分布的研究. 动物学报, 1990, 36(3): 244–250. DOI
- [2] 沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369–373. DOI
- [3] 陈大庆, 段辛斌, 刘绍平, 施炜纲, 王博. 长江渔业资源变动和管理对策. 水生生物学报, 2002, 26(6): 685–690. DOI
- [4] 刘添荣, 邓伟兴, 许梓晓, 林建志. 珠江流域西江下游渔业现状调查与分析. 中国渔业经济, 2008, 26(2): 81–87. DOI
- [5] 赵帅, 赵文阁, 刘鹏. 松花江干流嫩江至同江段鱼类物种资源调查. 农学学报, 2011, 1(6): 53–57. DOI
- [6] 杨学明, 李思发. 长江鲢、草鱼原种——人繁群体生长差异与生化遗传变化. 中国水产科学, 1996, 3(4): 1–10. DOI
- [7] 曹婷婷, 白俊杰, 王解香, 于凌云. 草鱼遗传结构和遗传多样性的研究概况. 中国农学通报, 2012, 28(5): 76–80. DOI
- [8] Liu ZJ, Cordes JF. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238(1–4): 1–37. DOI
- [9] 薛国雄, 刘棘, 刘洁. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析. 中国水产科学, 1998, 5(1): 1–5. DOI
- [10] 张四明, 汪登强, 邓怀, 余来宁. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究. 水生生物学报, 2002, 26(2): 142–147. DOI
- [11] Zhang ZW, Cao ZM, Zhou JS, Wu TT. Genetic structure analyses of different populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using the TRAP technique. *Chin J Agric Biotechnol*, 2007, 4(1): 27–32. DOI
- [12] Chen Q, Wang CH, Lu GQ, Song X, Xu JW, Yang QL, Li SF. Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from native and colonized regions using ISSR markers. *Biochem System Ecol*, 2009, 37(5): 549–555. DOI
- [13] Liu F, Xia JH, Bai ZY, Fu JJ, Li JL, Yue GH. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*, 2009, 297(1–4): 51–56. DOI
- [14] 王解香, 于凌云, 白俊杰, 樊佳佳, 全迎春. 草鱼 EST-SSR 标记及 5 个不同地域群体的遗传结构分析. 动物学杂志, 2011, 46(5): 24–32. DOI
- [15] 周盼, 张研, 徐鹏, 鲁翠云, 孙效文. 基于 26 个微卫星标记的三江水系草鱼遗传多样性分析. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1011–1020. DOI
- [16] Xia JH, Liu F, Zhu ZY, Fu JJ, Feng JB, Li JL, Yue GH. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs. *BMC Genomics*, 2010, 11: 135. DOI
- [17] Li JL, Zhu ZY, Wang GL, Bai ZY, Yue GH. Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellites in grass carp. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(6): 1114–1116. DOI
- [18] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590. DOI
- [19] Kalinowski T, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, 2007, 16(5): 1099–1106. DOI
- [20] Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3): 564–567. DOI
- [21] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739. DOI
- [22] 韩忠民. 知经纬度计算两点精确距离. 科技传播, 2011(11): 196, 174. DOI
- [23] Maruyama T, Fuerst PA. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of

- alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 1985, 111(3): 675–689. [DOI](#)
- [24] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155(2): 945–959. [DOI](#)
- [25] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*, 2002, 11(2): 155–165. [DOI](#)
- [26] Li DY, Kang DH, Yin QQ, Sun XW, Liang LQ. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *J Genet Genomics*, 2007, 34(11): 984–993. [DOI](#)
- [27] 王长忠, 梁宏伟, 邹桂伟, 罗相忠, 李忠, 田华, 呼光富. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析. *遗传*, 2008, 30(10): 1341–1348. [DOI](#)
- [28] 杨弘, 李大宇, 曹祥, 邹芝英, 肖炜, 祝璟琳. 微卫星标记分析罗非鱼群体的遗传潜力. *遗传*, 2011, 33(7): 768–775. [DOI](#)
- [29] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Human Genet*, 1980, 32(3): 314–331. [DOI](#)
- [30] Zheng K, Lin KD, Liu ZH, Luo C. Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang River group. *J Genet Genomics*, 2007, 34(4): 321–330. [DOI](#)
- [31] 傅建军, 王荣泉, 刘峰, 宣云峰, 郭诗照, 李家乐. 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. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(4): 433–439. [DOI](#)
- [32] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 童金苟. 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. [DOI](#)
- [33] 李思发, 周碧云, 倪重匡, 陈臻祺. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙和草鱼原种种群形态差异. *动物学报*, 1989, 35(4): 390–398. [DOI](#)
- [34] Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1996, 144(4): 2001–2014. [DOI](#)
- [35] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1975, 29(1): 1–10. [DOI](#)
- [36] Kalinowski ST. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*, 2002, 88(1): 62–65. [DOI](#)
- [37] Kalinowski ST. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity*, 2005, 94(1): 33–36. [DOI](#)
- [38] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987: 159–164. [DOI](#)
- [39] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611–2620. [DOI](#)

## •综合信息•

### Lewin 基因 X(中文版)——分子生物学的圣经级巨著

作者: (美)J.E.克雷布斯 等 译者: 江松敏 ISBN: 978-7-03-036276-6

页码: 1200 定价: 298.00 元 出版时间: 2013 年 1 月

#### 内容简介

Benjamin Lewin 的《基因》出版之时就已经为这本书设定了很高的标准, 并成为一本分子生物学与分子遗传学领域国际通用的最优秀的参考书籍。过去几十年中的 9 个版本见证着分子生物学与分子遗传学日新月异的变化。作为《基因》系列的最新版本, 《Lewin 基因 X》(中文版)对分子生物学和分子遗传学进行了精彩的论述, 内容涵盖了基因的结构、序列、组织和表达。为了提供分子生物学领域中快速多变的最新知识, 21 位科学家编写和修正了其各自领域的相关内容, 他们的专业知识已经深入贯穿于这本书中, 使得本书成为相关领域当今最新颖、最全面的参考书。

#### 本书特色

全新的第 3 章“分子生物学与遗传工程中的方法学”, 提供了分子生物学中实验技术的概念和操作方法介绍; 全新的第 8 章“基因组进化”, 把在前一版本中分散于各章节的信息进行了组合、扩展和更新, 并汇集于本章; 第 22 章“mRNA 的稳定性和定位”被重新编写以便于涵盖更多更新的前沿内容; 第 30 章“调节性 RNA”增加了 RNAi 途径的知识; 大量崭新的精美插图反映了相关领域的最新进展, 尤其是有关染色质结构与功能、表观遗传学, 以及真核生物中非编码 RNA 和微 RNA 所介导的调控。