长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析

廖小林[1,2] 俞小牧[1] 谭德清[1] 童金苟[1]
(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用已发表的鲤微卫星引物在草鱼中进行 PCR 扩增, 结果有 5 对引物(6 个座位) 能成功扩增并且有较高多态性, 等位基因数在 3—7 个之间。这些异种扩增的草鱼微卫星符合孟德尔遗传规律。测序证明草鱼中的微卫星核心重复序列部分与鲤中的原始核心序列相似, 也有一些变化。随后用这 6 个多态微卫星座位研究了来自长江水系的四个草鱼群体的遗传结构, 结果显示每个群体的平均等位基因数在 3.8 与 4.8 之间, 平均观测杂合度(Ho) 在 0.4000 与 0.5741 之间, 平均期望杂合度(H_E) 在 0.4773 与 0.6489 之间, 有多个座位在不同的群体中偏离哈代- 温伯格平衡。遗传距离分析表明四川群体与洞庭湖群体遗传距离最远, 而嘉鱼群体与鄱阳湖群体遗传距离较近。分子变异分析(AMOVA) 表明, 群体内遗传变异与群体间遗传变异分别占总遗传变异的 95.60% 与 4.40%, 固定系数(F_{ST}) 为 0.044, 这表明长江水系草鱼目前的群体分化很微弱。

关键词: 草鱼; 微卫星 DNA; 异种扩增; 遗传结构; 分子变异分析
中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0113-07

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)作为半洄游性的四大家鱼之一, 是目前中国乃至世界上产量最大的淡水经济鱼类。草鱼在中国的主要河流都有分布, 但长江草鱼资源最为丰富, 产卵场散布于从四川到安徽 700km 长的干流江段, 以及汉江、湘江等主要支流中[1]。由于长江鱼类的生境特别是产卵场不断受到破坏, 因此, 采取各种措施保护传统的四大家鱼的种质资源, 是水产业可持续发展的关键。深入研究遗传结构与遗传多样性是科学制定资源保护与开发规划的基础。迄今为止, 已经在同工酶[2,3]、线粒体 DNA[1,4]、RAPD[5] 水平上对长江水系草鱼遗传结构与遗传多样性进行了研究, 积累了一些资料, 但有些结论并不一致, 因此仍需利用新的分子标记对其进行深入研究。

微卫星(Microsatellite) 技术是近年来广泛应用的 DNA 标记技术。微卫星或称简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR) 是由 1—6 个碱基组成的短串联重复序列, 其座位高度丰富, 变异率高并且散布于整个真核生物基因组[6]。相对于同工酶和 RFLP, 微卫星标记是一类重复性好、较易操作的共显性 DNA 分子遗传标记, 在硬骨鱼类中表现出高度多态性, 已经在家系鉴定、遗传作图、群体遗传分析、育种计划以及系统发生研究等多个遗传学研究领域得到应用。然而, 从基因组中分离微卫星常常费时费力。国内利用微卫星 DNA 研究淡水鱼类遗传多样性和群体遗传结构的报道很少, 迄今没有克隆分离草鱼等重要淡水经济鱼类微卫星的报道。由于微卫星侧翼序列区为单拷贝, 在亲缘关系较近的物种间保守性较高, 利用已报道的鱼类微卫星引物来扩增亲缘关系较近种已成为可能[7]。本文利用已发表的鲤(*Cyprinus carpio*) 微卫星引物[8,9] 来对草鱼进行异种扩增, 筛选多态性较高的微卫星座位, 对长江水系草鱼的群体遗传结构与群体分化进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与 DNA 抽提 草鱼样本取自长江水系,

收稿日期: 2003-12-11; 修订日期: 2004-11-20
基金项目: 中国科学院知识创新重要方向性项目(KSCX2-SW-110); 国家自然科学基金(30771011) 资助
作者简介: 廖小林(1978—), 男, 湖南澧县人; 博士研究生; 主要从事鱼类细胞遗传及分子群体遗传学研究。周建峰、王忠卫、游翠红在实验过程中给予帮助, 谨致谢忱
通讯作者: 童金苟, E-mail: jgtong@ihb.ac.cn

分四个群体共109尾。其中四川群体18尾,取自四川宜宾江段;嘉鱼群体25尾,取自湖北嘉鱼江段;鄱阳湖群体34尾,取自江西湖口;洞庭湖群体32尾,取自湖南沅江市。另外,在繁殖季节利用人工授精方法获得草鱼的全同胞家系。每尾鱼取少量尾鳍组织分别保存于95%的酒精中。基因组DNA抽提采用稍加修改的酚/氯仿法[10]。

1.2 微卫星座位筛选、PCR扩增及其产物分离 微卫星引物根据发表的27对鲤引物序列(MFW-××)[8]和18对锦鲤引物序列(Koi××)[9]合成。有应用价值的异种扩增微卫星座位应符合:1)该座位在电泳图谱上有清晰可见并呈现多态性的扩增产物;2)该座位在家系材料中应符合孟德尔遗传分离规律。PCR反应总体积为12.5μL,其中包括10—50ng DNA,1×PCR缓冲液(10mmol/L Tris-Cl pH8.3,1.5mmol/L $MgCl_2$,50mmol/L KCl),120μmol/L dNTPs,0.15μmol/L引物和0.5U *Taq* DNA合成酶(BioStar),最后加入一滴石蜡油以防止PCR混合液蒸发。PCR程序如下:94℃预变性200s,随后进行38个循环(94℃变性35s,在适当温度(表1)退火40s,72℃延伸40s),72℃终延伸600s。取PCR产物4—6μL以7.5%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳缓冲液为1×TBE,电压为10V/cm。电泳完毕后,凝胶在浓度为0.5μg/mL的溴化乙锭溶液中染色,用凝胶成像系统(GeneGenius,SYNGENE)照相。选取同一座位基因型不同个体的PCR产物集中在一块凝胶上按上述条件电泳分离,通过与分子量标记pBR322 DNA/*Msp* I比较来判读等位基因大小。

1.3 PCR产物测序 用1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,切下目标电泳条带,用商品试剂盒(柏傲生物)纯化。纯化产物用T4 DNA连接酶连接到pMD 18-T质粒(TaKaRa),然后转化感受态*E. coli* DH5α,最后涂布含100μg/mL的氨苄青霉素LB平板(含有X-Gal与IPTG),37℃培养过夜。挑阳性单克隆菌落送上海博亚生物技术公司测序。

1.4 数据统计分析 用Arlequin(Version 2.0)[11]软件包计算各个群体的观测杂合度(Ho)、期望杂合度(H_E)[12]、平均基因多样性指数,并测试各个座位、各个群体哈代–温伯格平衡(Markov chain method)(参数为:dememorization=5000,iterations=5000)。利用分子变异分析(AMOVA)方法[13]计算群体遗传结构,其中总遗传变异被分成群体内遗传变异和群体间遗传变异。用Arlequin计算Nei's[12]与Reynolds's遗传距离[14],并根据Nei's遗传距离用MEGA(Version 2.1)[15]构建UPGMA树。

2 结果

2.1 草鱼微卫星座位筛选 根据上述筛选原则,从鲤微卫星中筛选出6个可用于草鱼的微卫星座位,它们是MFW1(共扩增出两个座位:MFW1-1,MFW1-2)、MFW5、MFW15、Koi3和Koi20。图1是5对鲤微卫星引物在草鱼中扩增电泳图谱。测序结果显示,这些扩增产物都含有以2—4个碱基为重复单位的多重复单元,其中Koi3引物的扩增产物出现了以2碱基(GA)与4碱基(AAAG)为重复单位的两个重复单元(表1,图2)。这表明,在草鱼中通过异种扩增获得的产物确为微卫星座位,可以作为分子标记对草鱼进行进一步的遗传分析。

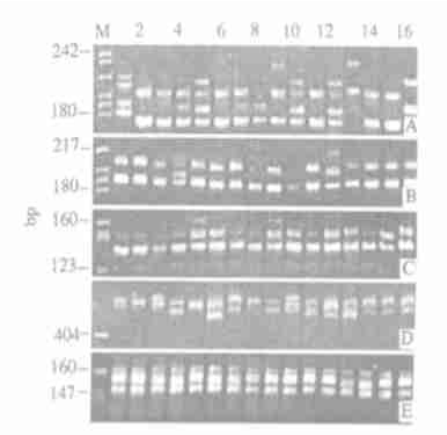


图1 5对鲤微卫星引物在草鱼中扩增电泳图谱

M:DNA标准分子量pBR322 DNA/*Msp* I,1-16:来自洞庭湖群体的16个草鱼个体,A:MFW1,B:MFW5,C:MFW15,D:Koi3,E:Koi20

Fig 1 Electrophoretic patterns of cross-species amplification in grass carp using five pairs microsatellite primers from common carp. M: pBR322 DNA/*Msp* I molecular weight marker, 1-16: 16 individuals of Dongting Lake grass carp population

2.2 草鱼微卫星等位基因与座位变异 6个微卫星座位在草鱼中共扩增出29个等位基因,平均每个座位扩增出约5个等位基因(表1)。Koi20扩增出的等位基因数最少(3个),而MFW1-1与MFW1-2扩增出的等位基因数最多(7个)。等位基因大小范围在110bp(MFW15)与500bp(Koi3)之间。每个座位的观测杂合度(Ho)在0.2494(Koi3)与1.0000(Koi20)之间,而期望杂合度(H_E)在0.3868(Koi3)与0.6815(MFW1-2)之间(表1)。

表 1　鲤微卫星引物在草鱼中的扩增与多态性

Tab 1　Cross-species amplification and polymorphism of microsatellite from common carp in grass carp

座位 Locus	引物序列 Primers sequence	退火温度 T_m(℃)	核心重复序列 Core repeats motif	等位基因大小范围 Size range (base pair)	等位基因数 No. of alleles	观测杂合度(期望杂合度) $H_O(H_E)$
MFW1-1	FCTCCAGACTGTCATCAGGAG GAGGTGTACACTGAGTCACGC	60	$(TC)_{4}^{-}(CT)_{2}^{-}(TTC)_{2}^{-}(CA)_{2+16+2}$	173—203	7	0.2934(0.6739)
MFW1-2				203—239	7	0.3151(0.6815)
MFW5	FGAGATGCCTGGGGAAGTCAC AAAGAGAGCGGGGTAAAGGAG	60	$(CA)_{16+4}$	186—218	4	0.5620(0.4673)
MFW15	FCTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA GTTCACAAGGTCATTTCCAGC	60	$(TTA)_{2+1}$, $(GAA)_{3}$	110—190	4	0.3717(0.5434)
Koi3	GTTTTCTGTTGTAGGCTCTG TACTTCATCTCTCGCACTCA	46	$(GA)_{3+2+5}$, $(AAAG)_{8}$	466—500	4	0.2494(0.3868)
Koi20	TGCCCTCTCTTTCCTTCA CAGGCTTCAACACAAACACA	48	$(GGGA)_{1+3}$	156—180	3	1.0000(0.6149)

MFW1(181bp)

GAGGTGTACACTGAGTCACGCTCATGACAATACAGCCTCTGTAAACTACCTGTATTACATTTCTCTCTCCAAACACATAC
ACTCTCACACACACACACACACACACACACACACACACATTCTTCCACAGCAGGCTGAATTTCATCAGGTTCAAGCGCAG
AAGCTCCTGATGACAGTCTGGAG

MFW5(186bp)

AAAGAGAGCGGGGTAAAGGAGGGGACATAATCACACACACACACACACACACACACACACACACACACATACACACACAAATG
GTGTCTTGGGGGCCCCAATAAGCCTGCAAAGGTCAAAATAACCATAATTCACTTTTCACAAAACACACATGTGAGAAAA
TAGAGAGATTGTGACTTCCCCAGGCATCTC

MFW15(185bp)

GTTCACAAGGTCATTTTCAGCAAGATGAACCTCTCCGAAGAGGTTGATCTGGAGGACTGTATCCTCTTGACCCTAAAT
GAAGTTATTATCATTATGAATATGATTATATTTAATCATTTAGAAGAAGAAATTAGGAAAACAATGCATGAGAGTAAA
AGAAAATATTTCACAAAACAAAACAGGAG

Koi3(466bp)

TACTTCATCTCTCGCACTCACAAATACAAGCTGCAGGGAGACAAGCCCTGAAAGATCCATGATTAATTTGGCCCATTAAC
TGCCACTGCCATGGGAGAGAATAGGAGAAAGAGAGAGAGAGCAAAAAACTTATACCCTCAATGCTCATTTGCTCATTTA
AAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGATCAAATGTATAGTTCCATGTCCTCATCTTACCCTCCCCATCATCT
GTCAGTCGTACTGTAAGCATCGCACTGGTTGACCTAGACTCTCTCACCGTTTTTTTCTTTCTTCTGTTCTTTCCTCACTCA
GGGTCCCTCTACTCCGTTGAGACTACTCCAGTTAGGCTATGAAGCCAGTTTGACAGCTGCTCTCTTTCTGAAGTCATTCA
ACATTCTCAAACTTCCACCTGTCCCTCAAACCACAGCTGTTTGACAACAGAGCCTACAACAGAAAAC

Koi20(156bp)

CAGGCTTCAACACAAACACAGACTAAAGCACCGCTCCACCTTAGCGCAATTAGCGCAGCACACATTGCTCGAGGGCGT
GAGAGGAAATGAGTTTTTTGGTAGGCGTGGGGAAAATGGGGGAAAGGAGGGAGGGAGGGATGAAGGAAAGAGAGGG
CA

图 2　5对鲤微卫星引物在草鱼中的扩增产物的核酸序列(═表示引物序列, ▬表示重复区)

Fig. 2　Nucleotide sequences of PCR products amplified in grass carp using 5 pairs common carp microsatellite primers
(═ indicates primers sequence, ▬ indicates repeats region)

2.3 哈代– 温伯格平衡与群体内遗传变异

座位MFW5 在鄱阳湖群体($P > 0.05$)、嘉鱼群体($P > 0.01$)、洞庭湖群体($P > 0.05$)符合哈代– 温伯格平衡;MFW15 在鄱阳湖群体($P > 0.05$)、洞庭湖群体($P > 0.05$)符合哈代– 温伯格平衡,在其他群体偏离;Koi3 在鄱阳湖群体($P > 0.05$),洞庭湖群体($P > 0.01$)符合哈代– 温伯格平衡,在其他群体偏离:座位MFW1-1、MFW1-2 与Koi20 在所有群体都偏离了哈代– 温伯格平衡。从表2可以看出,每个群体的平均等位基因数在3.8与4.8之间,平均观测杂合度(H_O)在0.4000与0.5741之间,平均期望杂合度(H_E)在0.4773与0.6489之间。表2还显示了各个群体的平均基因多样性指数,四川群体平均基因多样性指数最高(0.6283±0.3603),洞庭湖群体最低(0.4533±0.2704),鄱阳湖群体与嘉鱼群体平均基因多样性指数差异不大(0.5384±0.3118 与0.5426±0.3155)。AMOVA 分析结果显示,群体内的遗传变异占总遗传变异的95.60%(表3),这表明所分析的四个草鱼群体绝大部分遗传变异是由群体内的遗传变异提供的。

表2 四个草鱼群体的遗传变异

Tab.2 Genetic variations at all loci in four populations of grass carp

	平均观测杂合度 H_O	平均期望杂合度 H_E	平均等位基因数 Average no. of alleles	平均基因多样性 Average gene diversity
SCC	0.5741	0.6489	3.8	0.62834±0.3603
PYC	0.4363	0.5544	4.0	0.5384±0.3118
JYC	0.4000	0.5646	4.8	0.5426±0.3155
DTC	0.4506	0.4773	4.0	0.4533±0.2704

注:SCC:四川草鱼;PYC:鄱阳湖草鱼;JYC:嘉鱼草鱼;DTC:洞庭湖草鱼

Note: SCC: Sichuan grass carp; PYC: Poyang Lake grass carp; JYC: Jiayu grass carp; DTC: Dongting Lake grass carp

表3 四个草鱼群体的**AMOVA**分析结果

Tab.3 AMOVA analysis results for four populations of grass carp

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	变异组成 Variance components	变异百分数 Percentage of variation
群体间 Among populations	3	16.485	0.07301	4.40
群体内个体间 Among individuals within populations	214	339.625	1.58703	95.60
合计 Total	217	356.110	1.66004	

2.4 群体间遗传变异

草鱼群体之间的Nei's 和Reynolds's 遗传距离见表4。其中四川群体与洞庭湖群体遗传距离最远,而嘉鱼群体与鄱阳湖群体遗传距离较近。采用逐对比较(Pairwise comparisons)方法[16]评估群体间的分化情况,除了嘉鱼群体与鄱阳湖群体未见分化外($P = 0.30$),其他群体间存在明显分化($P < 0.05$)。图3是基于Nei's 遗传距离构建的UPGMA树,四个草鱼群体聚成了两支,其中嘉鱼群体与鄱阳湖群体、洞庭湖群体聚成一支,而四川群体单独形成一支。但是AMOVA 分析结果表明,群体间的遗传变异仅占总遗传变异的4.40%(表3),固定系数(F_{ST})为0.044,群体分化微弱,或处于未分化与开始分化的临界点。

表4 草鱼每两个群体之间的**Nei's**(对角线之下)与**Reynolds's** 遗传距离(对角线之上)

Tab.4 Nei's (below diagonal) and Reynolds's (above diagonal) genetic distances between populations of grass carp

	SSC	PYC	JYC	DTC
SSC	—	0.0667	0.0624	0.1068
PYC	0.0645	—	0.0026	0.0297
JYC	0.0605	0.0026	—	0.0367
DTC	0.1013	0.0293	0.0360	—

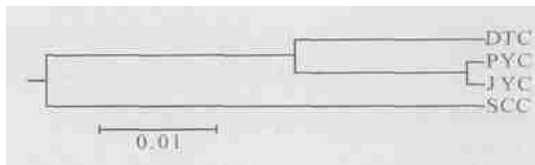


图3 基于Nei's 遗传距离构建的四个草鱼群体UPGMA 树

Fig.3 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance for four populations of grass carp

3 讨论

3.1 微卫星座位的保守性与变异

本研究利用鲤微卫星引物来扩增草鱼,获得了6个多态性较高的微卫星座位。测序结果显示,在引物序列方面,草鱼中除了MFW15座位引物区核酸序列与鲤有一个碱基发生颠换外,其他5个与鲤完全相同。这表明一部分微卫星座位两端的侧翼序列在这两种鱼中有较高保守性。但是,相对鲤中的微卫星而言,草鱼微卫星从扩增产物大小到核心重复序列等方面都有一定变异。例如MFW1、MFW5 和MFW15 在鲤中主要为CA 重复[8],但在草鱼中出现CA、TC、CT、TTA 和GAA 重复;Koi3 和Koi20 在鲤中分别为$(TAT)_6$和$(CT)_{12}$重复[9],但在草鱼中,Koi3 变为$(GA)_{10}$和$(AAAG)_8$重复,Koi20 变为$(GGGA)_4$。在

扩增产物大小方面, 因为插入了较长的非重复序列, 草鱼 Koi3 的产物大小达到了微卫星产物检测的上限(466—500bp) , 而其他 5 个微卫星座位在鲤与草鱼中的扩增产物片段大小基本相似。发现 MFW1 在草鱼中有两个扩增座位(MFW1-1 与 MFW1-2) , 在鲤中也曾发现了相似情况(未发表资料) , 这可能与鱼类某些基因加倍有关[17]。除了在草鱼中, MFW1 座位在鲤[8]、鲢(*Hypophthalmichtys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)[7,18]、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、鲫(*Carassius carassius*)、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)、大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*)、大鳞突吻鱼(*Varicorhinus macrolepidotus*)、稀有 鲫(*Gobiocypris rarus*)、丁 (*Tinca tinca*)、翘嘴红 (*Erythroculter ilishaeformis*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)[18]、印度野鲮(*Labeo rohita*) (GenBank 登录号: AY291594) 中都能成功扩增, 这说明 MFW1 引物的侧翼序列区在部分亲缘关系较远, 亚科间的鲤科鱼类中都有相当高的保守性。笔者推测 MFW1 的引物序列可能处于某一基因下游(已有报道微卫星引物处于某些基因的下游[19]) , 而这个基因在鱼类的进化过程中可能经历了加倍事件[17]。

3.2　哈代– 温伯格平衡与群体内遗传变异

主要由于杂合子的严重缺失, 在所研究的 6 个微卫星座位中, MFW1-1, MFW1-2 与 Koi20 共 3 个座位在所有群体中偏离哈代– 温伯格平衡, 而其他 3 个座位至少在一个群体中偏离哈代– 温伯格平衡。许多原因可能导致这样的情况, 比如人工选择、迁移、突变与近交, 但在草鱼中具体是哪一个(几个) 发生了作用, 目前还不清楚。

遗传多样性的最普通评价标准是杂合度、等位基因多样性(每个座位的等位基因数目) 及多态座位的比例[20]。这 4 个草鱼群体的平均观测杂合度在 0.40 到 0.57 之间(Koi20 在所有群体中的观测杂合度为 1, 如果除去这个座位而得到的四个草鱼群体平均观测杂合度会更低) , 而平均等位基因数在 3.8 到 4.8 之间(表 2) 。DeWoody 和 Avise[2] 基于 13 种淡水鱼类统计而得出的平均杂合度为 0.46, 平均等位基因数为 7.5, 因此长江草鱼微卫星等位基因数目偏少, 遗传多样性较低。张四明等[4,5] 在线粒体 DNA 和 RAPD 水平上发现草鱼遗传多样性较低, 但与其生物量巨大相矛盾, 故他们推测草鱼可能在历史上经历了一次遗传瓶颈。其他研究者在同工酶[3]、线粒体 DNA[5] 水平上也发现草鱼遗传多样性很低。但吴力钊与王祖熊[2] 用同工酶研究发现草鱼的遗传变异并不低, 这与其他研究者及作者的结论不符。Nei 等[20] 认为用等位基因多样性来评估统计学上的遗传瓶颈比用杂合度更灵敏。通过微卫星标记研究草鱼遗传多态性, 作者发现草鱼的遗传变异确实较低, 并且有多个座位严重偏离哈代– 温伯格平衡, 因此草鱼可能确实在历史上经历了遗传瓶颈[4,5]。如果这个推测接近事实的话, 草鱼可能在发生遗传瓶颈初期高度近交, 导致其遗传多样性降低并严重偏离哈代– 温伯格平衡。Luikart 等[22] 提出了“隐蔽遗传瓶颈”(Cryptic bottleneck) 的概念。他们认为如果传统的统计学监测方法不能发现, 但可以通过遗传检测方法所揭示的遗传瓶颈, 就是“隐蔽遗传瓶颈”。他们还指出, 对于一些繁殖率高的种类, 如昆虫、鱼类、植物以及两栖动物, 在某些情况下下一代可能只是由少数个体繁殖得来, 这就可能产生“隐蔽遗传瓶颈”, 而有效群体大小(*Ne*) 并没有减少。历史上长江水系草鱼生物量巨大, 有效群体大小也应该很大, 因此草鱼中即使存在遗传瓶颈, 也可能只是“隐蔽遗传瓶颈”。长江中下游有许多湖泊为草型湖泊, 这种生境适合草鱼的快速增殖, 但其本身遗传变异缺乏, 这就造成了草鱼生物量巨大, 而遗传多样性低的矛盾。长江中下游的许多湖泊过去与长江相通, 现在都变为季节性通江或不通江, 这一过程(加上其他因素) 与近年来草鱼天然种质资源迅速衰退的关联性, 值得深入探讨。

3.3　群体间遗传变异

根据 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 树, 四个草鱼群体聚成了两支, 其中嘉鱼群体与鄱阳湖群体、洞庭湖群体聚成一支, 而四川群体单独形成一支。四川处于长江上游, 而其他三个采样地点处于长江中游, 由于地理距离的隔离, 四川群体理应与其他三个群体有较大的遗传距离。研究结果显示, 四川群体与洞庭湖群体遗传距离最远, 与鄱阳湖群体间的遗传距离次之, 而离嘉鱼群体较近。鄱阳湖群体样品采自江西湖口, 而湖口所处位置正是长江与鄱阳湖的交汇处。鄱阳湖草鱼群体与长江干流草鱼群体可能交流频繁, 因此鄱阳湖群体与嘉鱼的长江干流群体的遗传距离较近是可能的。洞庭湖群体样品采自南洞庭湖的沅江市, 离湘江注入洞庭湖的位置不远。由于湘江也是草鱼的产卵场之一[1], 洞庭湖草鱼应该有相当一部分是来自湘江, 四川群体与洞庭湖群体间遗传距离在所研究的四个群体中可能最远。根据计算结果, 也正是这两个群体间遗传距离最远。张四明等[4] 用 RAPD 技术研究嘉鱼、汉江、瑞昌与湘

江四个草鱼群体发现,嘉鱼与湘江群体遗传距离最远,这也说明湘江草鱼群体与长江干流草鱼群体是有些差异的。AMOVA 分析结果表明,群体间的遗传变异仅占总遗传变异的 4.40%,而 95.60% 的遗传变异是由群体内提供的。这表明四个草鱼群体绝大部分遗传变异发生在群体内,而非群体间。根据群体间分化结果,除了嘉鱼群体与鄱阳湖群体未见分化外($P = 0.30$),其他群体间存在分化($P < 0.05$)。但固定系数(Fst)为 0.044,小于 0.05,说明这四个草鱼群体间只存在轻微分化,也可以认为群体间的遗传分化是非常微弱的[23]。过去有学者认为长江水系的草鱼没有遗传分化,即只有一个"长江群体"[1,3—5],根据微卫星 DNA 研究结果,作者认为这种说法至少在目前还是基本可行的。

参考文献:

[1] Li S F, Lu G Q, Bernatchez L. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Acta Zool. Sin.*, 1998, **44**(1): 82—93[李思发, 吕国庆, 贝纳切兹. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析. 动物学报, 1998, **44**(1): 82—93]

[2] Wu L, Xiong Q. Biochemical genetic structure and variation in a natural population of grass carp from the middle reaches of Yangtze River [J]. *Acta Genet. Sin.*, 1992, **19**(3): 221—227[吴力钊, 熊全沫. 长江中游草鱼天然种群的生化遗传结构及变异. 遗传学报, 1992, **19**(3): 221—227]

[3] Zhao J L, Li S F. Isoenzyme analysis of population divergence of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River[J]. *J. Fish. China*, 1996, **20**: 104—109[赵金良, 李思发. 长江中下游鲢、鳙、青鱼、草鱼种群分化的同工酶分析[J]. 水产学报, 1996, **20**: 104—109]

[4] Zhang S M, Deng H, Wang D Q, *et al*. Population structure and genetic biodiversity of silver carp and grass carp from populations of Yangtze River Systems revealed by RAPD[J]. *Acta Hydrobiol. Sin.*, 2001, **25**(4): 324—330[张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 324—330]

[5] Zhang S M, Wang D Q, Deng H, *et al*. Mitochondrial DNA variations of silver carp and grass carp in populations of the middle reaches of the Yangtze River by using RFLP-PCR[J]. *Acta Hydrobiol. Sin.*, 2002, **26**(2): 142—147[张四明, 汪登强, 邓怀, 等. 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]

[6] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**: 4127—4138

[7] Tong J, Wang Z, Yu X, *et al*. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp[J]. *Mol. Ecol. Notes*, 2002, **2**: 245—247

[8] 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

[9] 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. Genet. Genomics*, 2001, **266**: 353—362

[10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[11] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis, Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000

[12] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1979, **76**: 5269—5273

[13] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. *Genetics*, 1992, **131**: 479—491

[14] Reynolds J, Weirs B S, Cockerham C C. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance[J]. *Genetics*, 1983, **105**: 767—779

[15] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al*. *MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis* software, Arizona State University, Tempe, Arizona, 2001

[16] Raymond M, Rousset F. An exact test for population differentiation [J]. *Evolution*, 1995, **49**: 1280—1283

[17] Van de Peer Y, Taylor J S, Meyer A. Are all fishes ancient polyploids? [J]. *J. Struct. Funct. Genomics*, 2003, **2**: 65—73

[18] Tong J, Yu X, Liao X. Characterization of a highly conserved microsatellite marker with utility potentials in cyprinid fishes[J]. *J. Appl. Ichthyol.*, 2005(in press)

[19] David L, Blum S, Feldman M W *et al*. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite Loci[J]. *Mol. Biol. Evol.*, 2003, **20**(9): 1425—1434

[20] Nei M, Marayuma T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations[J]. *Evolution*, 1975, **29**: 1—10

[21] DeWoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals[J]. *J. Fish Biol.*, 2000, **56**: 461—473

[22] Luikart G, Sherwin W B, Steele B M, *et al*. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change[J]. *Mol. Ecol.*, 1998, **7**: 963—974

[23] Balloux F, Lugorr-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. *Mol. Ecol.*, 2002, **11**: 155—165

MICROSATELLITE DNA ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF GRASS CARP IN YANGTZE RIVER SYSTEM

LIAO Xiao-Lin[1,2], YU Xiao-Mu[1], TAN De-Qing[1] and TONG Jin-Gou[1]

(1. *Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology. Wuhan* 430072; 2. *The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) has been one of the most important traditional domestic freshwater aquaculture fish in China. Its habitat includes major rivers and lakes in China, but it is most abundant in Yangtze River and its adjacent lakes. In the present study, the genetic diversity and population structure of grass carp from Yangtze River system were investigated using microsatellite DNA markers.

In total 109 individuals were collected from four sites of the Yangtze River System including Yibin, Sichuan; Jiayu, Hubei; Dongting Lake, Hunan and Poyang Lake, Jiangxi. A full-sib family was prepared using artifical fertilization. Genomic DNA was extracted from ethanol-preserved fin tissues by using phenol-chloroform method. Using a set of microsatellite primers originally reported in common carp (*Cyprinus carpio*), we carried out many cross-species PCR amplifications. PCR products were separated on 7.5% nondenaturing polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide in water and visualized with ultraviolet. A successfully amplified locus with clear banding pattern (i.e. one or two bands) was subject to test for genetic segregation in a full-sib grass carp family before it was considered to be used in population analysis. Purified PCR products were cloned into *E. coli* DH5α strain using pMD-18T vector, and positive clones were selected and sequenced by Shanghai BioAsia Biotech Company for confirmation of repeat motifs. The size of alleles was scored by comparison with pBR322 DNA/*Msp* I markers.

Five microsatellite primers successfully amplified six loci with reasonable polymorphism in grass carp. The number of alleles in these loci ranged from 3 to 7. These six microsatellite loci were inherited with Mendelian mode in a test full-sib grass carp family. Sequencing analysis for the PCR products in grass carp confirmed that all these six loci contained core repeat motifs, and some di-nucleotide motifs were similar to those in common carp (e.g. CA repeat) while others were new in grass carp, especially those tri-nucleotide repeats (i.e. TTA and GGA). Six microsatellite loci in grass carp, i.e. MFW1-1, MFW1-2, MFW5, MFW15, Koi3 and Koi20, were applied to subsequent studies on genetic diversity and possible population structure of grass carp samples from the Yangtze River System including river and its major adjacent lakes. The results showed that the number of alleles of a population ranged from 3.8 to 4.8 on average, and mean observed heterozygosity (Ho) from 0.40 to 0.57, while mean expected heterozygosity (H_E) from 0.48 to 0.65. After applying Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test, several loci were found to be significantly deviated from HWE in some populations in which deficiency of heterozygotes was apparent. Genetic distance analysis showed that the largest distance was between Sichuan and Dongting Lake population and the smallest distance was between Jiayu and Poyang Lake population. However, the analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that almost majority of the variance in the grass carp was within populations (95.60%), and only small proportion was among populations (4.40%). The lower level of overall genetic diversity and particularly lower Fixation Index (Fst= 0.044) indicated that the grass carp in Yangtze River system had a relatively lower genetic variation and its genetic structure between populations was weak.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus;* Microsatellite DNA; Cross-species amplification; Genetic structure; Analysis of molecular variance (AMOVA)