

黄河鲤野生和人工养殖群体遗传多样性分析

张芹¹, 宋威², 侯志鹏², 冯建新¹ (1.河南省水产科学研究院, 河南郑州 450044; 2.河南工业大学化学化工学院, 河南郑州 450001)

摘要 采用微卫星技术对黄河鲤选育群体和河南省境内2个野生群体进行遗传多样性分析。在12个微卫星座位上共检测出48个等位基因, 3个群体在12个位点的平均遗传分化指数(F_{st})为0.04, 表明群体分化造成的变异占4%, 而96%的变异来源于群体内部。结果显示, 3个群体间差异不明显, 一方面说明养殖群体在科学的人工选育条件下能够保留一定水平的多样性, 另一方面也说明不断恶化的自然环境对野生黄河鲤群体造成的影响是巨大的。

关键词 黄河鲤; 微卫星; 种质资源; 野生群体; 人工养殖群体

中图分类号 Q31 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)16-0091-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.16.024

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Genetic Diversity Analysis of Wild and Cultured Population of *Cyprinus carpio*

ZHANG Qin¹, SONG Wei², HOU Zhi-peng² et al (1. Henan Academy of Fishery Science, Zhengzhou, Henan 450044; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001)

Abstract The genetic diversity of breeding population and 2 wild populations in Henan of *Cyprinus carpio* were studied by using microsatellite marker technology. A total of 48 alleles were detected for 12 microsatellite loci. Average F_{st} of 3 populations at 12 microsatellite loci was 0.04, which showed that the variation caused by group differentiation accounted for 4%, and the internal variation was 96% of the total variation. The results demonstrated that there was no significant difference among three populations. On the one hand, the germplasm resource and the genetic diversity were better in the cultured population, and on the other hand, the worsening environment had great influences on the wild population of *C. carpio*.

Key words *Cyprinus carpio*; Microsatellite; Germplasm resources; Wild population; Cultured population

黄河鲤是我国著名的四大淡水鱼类之一, 有着比较成熟的人工养殖技术。近年来, 在河道中捕捞的黄河鲤个体以低龄化、小型化为主, 说明酷鱼滥捕现象十分严重, 黄河鲤野生资源遭到严重破坏。为了保护黄河鲤的种质资源, 开展黄河鲤良种保护和最优线性无偏预测(BLUP)育种工作, 需要在物种遗传多态性水平上进行分析。目前关于黄河鲤群体遗传多样性的研究较多^[1-7], 而黄河鲤遗传图谱的构建工作已经开展^[8-9], 但黄河鲤野生种质资源还未得到充分开发。微卫星标记在鱼类遗传育种研究中有着广泛应用^[10-11]。笔者运用微卫星技术对河南省境内野生和人工养殖的黄河鲤群体进行遗传变异研究, 旨在对黄河鲤的种质状况进行科学评价, 利用分子生物学技术充分挖掘黄河鲤的野生种质资源, 为黄河鲤良种的选育提供重要参考, 从而对该种质资源进行合理开发、利用与保护。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 野生群体1, 采集于河南省长垣县天然文岩渠(属于黄河一级支流), 30尾, 以下简称“W”群体; 野生群体2, 取自河南省巩义市伊洛河口, 27尾, 以下简称“L”群体; 人工养殖群体, 采自河南黄河鲤鱼良种场, 30尾, 以下简称“Y”群体。样本剪尾鳍, 乙醇保存, 提取DNA后-70℃下低温保存。

1.2 PCR反应 DNA的提取使用树脂型基因组DNA提取

试剂盒(北京赛百胜基因技术有限公司)。12对微卫星引物^[12-14], 均由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成, 具体信息见表1。

表1 微卫星引物退火温度及等位基因大小

Table 1 Annealing temperature of microsatellite primers and size of alleles

| 名称 Name | 退火温度 Annealing temperature ℃ | 等位基因 大小 Size of alleles//bp | 名称 Name | 退火温度 Annealing temperature ℃ | 等位基因 大小 Size of alleles//bp |
|------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| MFW1 | 55 | 110~235 | HLJ041 | 53 | 202~312 |
| MFW4 | 55 | 80~210 | HLJ044 | 53 | 193~300 |
| MFW19 | 60 | 192~314 | HLJ046 | 53 | 97~250 |
| MFW24 | 55 | 250 | HLJ133 | 53 | 164~309 |
| MFW26 | 55 | 137~184 | HLJ328 | 60 | 200~345 |
| MFW28 | 60 | 250~336 | HLJ343 | 60 | 95~250 |

PCR反应体系: 10 mmol/L 4×dNTPs 200 μmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 引物 0.5 μmol/L, Taq酶 1 U, 模板DNA 0.5 μL。PCR反应程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55~60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃延伸5 min。PCR产物检测: 利用2%琼脂糖凝胶(含Gold view)电泳对PCR产物进行检测, 缓冲液为0.5×TBE, 使用凝胶成像系统观测并拍照。

1.3 数据处理 利用POPGENE软件计算各位点等位基因数(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)和群体Hardy-Weinberg平衡偏离^[2], 根据Botstein等^[15]公式计算多态信息含量(PIC), 采用UMGMA法构建系统发生树。

2 结果与分析

2.1 黄河鲤群体的遗传多样性分析 除了引物M24外, 其

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-45); 河南省现代农业产业技术体系项目(S2020-10); 国家水产种质资源共享服务平台项目(2020DKA30470); 农业基础性长期性科技工作项目(ZX08S172064); 河南省科技创新体系建设专项。

作者简介 张芹(1980—), 女, 河南新乡人, 高级水产师, 硕士, 从事鱼类遗传育种研究。

收稿日期 2019-12-10

他 11 组引物均在 3 个群体中扩增出多态性条带。在 11 个多态位点上共检测到 47 个等位基因,不同位点的等位基因数从 2 个到 6 个不等,大小为 80~345 bp。图 1 为引物 HLJ044

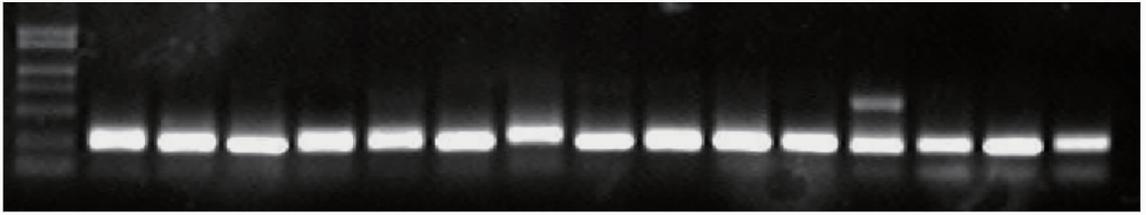


图 1 微卫星引物 HLJ044 对 WY 群体的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of WY population by using microsatellite marker HLJ044

表 2 3 个黄河鲤群体的遗传变异参数

Table 2 Parameters of genetic variation among 3 populations of *C. carpio*

| 群体 Population | N_a | N_e | H_o | H_e |
|------------------|-------|-------|-------|-------|
| W | 3.58 | 2.93 | 0.40 | 0.58 |
| L | 3.67 | 3.19 | 0.37 | 0.59 |
| Y | 3.58 | 2.69 | 0.31 | 0.58 |

等位基因分布频率的相对稳定是群体处于 Hardy-weinberg 平衡的一个表现,平衡群体的观测杂合度和期望杂合度不存在显著差异。但是,在实际的野生或养殖群体中^[16-20],等位基因频率或多或少都会偏离 Hardy-Weinberg 平衡,黄河鲤 W 和 Y 2 个群体中有 1/3 的位点偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。20 世纪七八十年代,全国范围内不同品系的鲤鱼间相互引种和杂交现象普遍存在,多种杂交鲤通过各种渠道混入了黄河干支流,河道内野生黄河鲤与其他品种鲤鱼进行杂交,使得野生黄河鲤的种质资源遭到了严重破坏,从而导致黄河鲤品质的下降。Y 群体只有一个位点未偏离 Hardy-Weinberg 平衡,说明高强度的人工选择对这些位点产生了较大的选择压力。该研究中豫选黄河鲤人工选育群体(即 Y 群体)的遗传变异参数低于鲁翠云等^[5]、李超等^[6]、李建林等^[7]的研究结果,可能是该试验中取样数量较少导致的偏差。

黄河鲤 3 个群体间遗传距离很小,反映出群体间的差异不大,差异主要来自群体内部的多多样性。数据显示 3 个群体在 12 个位点的平均遗传分化指数(F_{st})为 0.04,表明 4% 的变异是由于群体分化造成的,而 96% 的变异则来源于群体内部,显示了群体内部还存在一定的多样性。顾颖等^[1]和王新华等^[21]的研究也表明虽然选育群体中大部分位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,但黄河鲤种内仍保持了较高的遗传杂合度,与该研究结论相一致。该试验结果显示 Y 黄河鲤群体的多态性略低于其他 2 个群体,差异并不明显,说明经过多年的人工选择,Y 黄河鲤群体仍然保留了一定的多样性。该试验结果显示群体之间基因流大于 6,说明黄河鲤野生种群和人工养殖群体之间存在大量基因流,这可能与多年来持续不断的人工放流以及市民的放生行为有关。

伊洛河为黄河的支流,水量丰沛,环境相对开放;天然文岩渠虽然也是黄河的支流,但只有在上游水量大时,其径流

对 W 群体扩增结果的电泳图,表 2 为 3 个黄河鲤群体的遗传变异参数。

才流入黄河,当上游水量小时天然文岩渠就形成了一个半封闭的水域。2 个野生群体的种质资源除了要面临自然选择外,还要受到诸多人为因素(比如水质污染、酷渔滥捕、天然繁殖场隔离等)的影响,养殖群体混入天然群体后对种质的影响也不容忽视。Y 群体是一个经过长达 20 多年人工定向选择的群体,其面临的选择压力远大于 2 个自然群体。该试验结果显示虽然 3 个群体间存在差异,但差异不明显,一方面说明了养殖群体在科学的人工选育条件下能够保留一定水平的多样性,另一方面也说明不断恶化的自然环境对野生黄河鲤群体造成的影响是巨大的。

2.2 系统发生树分析和黄河鲤育种的选择 所有个体的系统发生树分析如图 2 所示。Y18 作为一个独立分支,遗传距离与其他个体较远,在育种中可以单独使用。Y25~Y29 遗传距离较近,属于一个分支。L4、L26、W22、W23、Y2、Y3 等不同种群中的个体在同一个分支中出现,可考虑作为近交时亲本使用。W24~W27、W18、W11 等文岩渠群体遗传距离较近,属于一个分支。未出现 L 群体集中出现的分支,笔者认为伊洛河群体是 3 个群体中个体间遗传距离最远的一个。Y 群体为人工繁殖群体,较多个体可以集聚在一起,说明该群体亲缘关系较近。

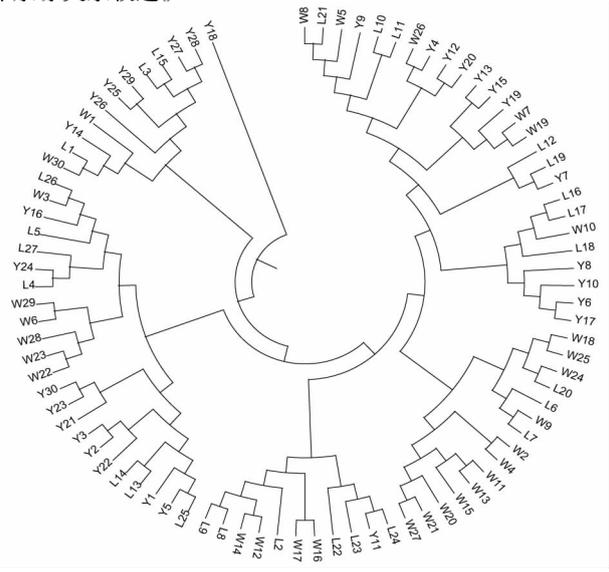


图 2 所有个体的系统发生树分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of all individuals

3 结论

Spitzweg 等^[22]运用微卫星技术为北河水龟建立了育种方案;Wang 等^[23]运用微卫星技术对河川沙塘鳢进行了亲本鉴定。该试验采用微卫星技术对不同来源的黄河鲤进行遗传背景分析,以期建立更加合理的制种策略。目前人工选择育种中一方面需要制备纯种,要利用遗传距离较近的个体做近交;另一方面要减少近交引起的衰退,可以考虑选择亲缘关系较远的不同来源的黄河鲤作为亲本,用来改善人工繁育群体中出现的衰退现象。

参考文献

- [1] 顾颖,鲁翠云,张芹,等.微卫星 QTL 标记分析豫选黄河鲤群体遗传结构及生长性状相关性[J].淡水渔业,2016,46(4):9-18.
- [2] 宋威,张芹,冯建新.环境因素对黄河鲤群体遗传多样性的影响[J].江苏农业科学,2011,39(5):323-325.
- [3] 关建义,张芹,屈长义,等.野生和人工选育黄河鲤遗传多样性的 ISSR 分析[J].河南师范大学学报(自然科学版),2010,38(4):128-131.
- [4] 佟雪红,董在杰,缪为民,等.建鲤与黄河鲤的 RAPD 分子标记及其杂交优势的遗传分析[J].广东海洋大学学报,2007,27(1):1-6.
- [5] 鲁翠云,张晓丽,顾颖,等.福瑞鲤与豫选黄河鲤选育群体的遗传结构及亲本间遗传距离分布[J].中国水产科学,2016,23(5):1091-1098.
- [6] 李超,鲁翠云,冯建新,等.性状相关微卫星标记分析黄河鲤群体的遗传潜力[J].水产学杂志,2012,25(4):1-7.
- [7] 李建林,李红霞,唐永凯,等.利用微卫星标记分析 6 个鲤鱼群体的遗传差异[J].福建农业学报,2012,27(9):936-940.
- [8] PENG W Z, XU J, ZHANG Y, et al. Erratum: An ultra-high density linkage map and QTL mapping for sex and growth-related traits of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Scientific reports, 2016, 6(1):1.
- [9] WANG X H, FU B D, YU X M, et al. Fine mapping of growth-related quantitative trait loci in Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematoferus*) [J]. Aquaculture, 2018, 484:277-285.
- [10] SUNDARAY J K, RASAL K D, CHAKRAPANI V, et al. Simple sequence

repeats (SSRs) markers in fish genomic research and their acceleration via next-generation sequencing and computational approaches [J]. Aquacult Int, 2016, 24:1089-1102.

- [11] XU K, DUAN W, XIAO J, et al. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding [J]. Sci China Life Sci, 2015, 58(2): 187-201.
- [12] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. 动物学研究, 2001, 22(3): 238-241.
- [13] 胡雪松, 葛彦龙, 李池陶, 等. 利用微卫星标记高效鉴定松浦镜鲤的亲缘关系 [J]. 水产学杂志, 2016, 29(5): 37-42.
- [14] NAPORA-RUTKOWSKI Ł, RAKUS K, NOWAK Z, et al. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains bred in Poland based on microsatellite, AFLP, and mtDNA genotype data [J]. Aquaculture, 2017, 473:433-442.
- [15] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Gen, 1980, 32(3): 314-331.
- [16] 马洪雨, 岳永生, 郭金峰, 等. 山东省三个鲤鱼群体遗传多样性及亲缘关系的微卫星标记分析 [J]. 湖泊科学, 2006, 18(6): 655-660.
- [17] 孙新, 魏振邦, 孙效文, 等. 镜鲤繁殖群体的遗传结构及微卫星标记与经济性状的关联性分析 [J]. 遗传, 2008, 30(3): 359-366.
- [18] 全迎春, 李大宇, 曹鼎辰, 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): 1541-1548.
- [19] 刘臻, 鲁双庆, 匡刚桥, 等. 湘江野鲤养殖群体和自然群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. 生态学杂志, 2007, 26(7): 1074-1079.
- [20] LEHOCZKY I, MAGYARY I, HANCZ C, et al. Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers [J]. Hydrobiologia, 2005, 533:223-228.
- [21] 王新华, 俞小牧, 冯建新, 等. 黄河鲤全同胞家系的微卫星标记亲子鉴定 [J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1023-1031.
- [22] SPITZWEG C, PRASCHAG P, DIRUZZO S, et al. Conservation genetics of the northern river terrapin (*Batagur baska*) breeding project using a microsatellite marker system [J]. Salamandra, 2018, 54(1): 63-70.
- [23] WANG P P, ZHAO C, CHEN S Q, et al. Parentage identification of *Odontobutis potamophila* based on microsatellite DNA markers [J]. Journal of genetics, 2018, 97:563-568.

(上接第 56 页)

- [3] 蒋跃明, 刘淑娟, 陈芳. 采后柑桔果实脱水及控制 [J]. 植物学通报, 1991, 8(2): 9-12.
- [4] SINGH R. 65-year research on citrus granulation [J]. Indian J Hort, 2001, 58(1/2): 112-144.
- [5] RITENOUR M A, ALBRIGO L G, BURNS J K, et al. Granulation in Florida citrus [J]. Proc Fla State Hort Soc, 2004, 117: 358-361.
- [6] 张名富. 柑桔果实粒化现象与天气等相关因素的关系研究 [J]. 中国南方果树, 2010, 39(4): 67-69.
- [7] WU L M, WANG C, HE L G, et al. Transcriptome analysis unravels metabolic and molecular pathways related to fruit sac granulation in a late-ripening navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [J]. Plants, 2020, 9: 1-20.
- [8] EL-ZEFTAWI B M. Factors affecting granulation and quality of late-picked Valencia oranges [J]. J Hort Sci, 1978, 53(4): 331-337.
- [9] 谭兴杰, 陈芳, 周永成, 等. 柑桔果实采后脱水的研究 [J]. 园艺学报, 1985, 12(3): 165-170.
- [10] 茅林春, 张上隆. 果胶酶和纤维素酶在桃果实成熟和贮藏中的作用 [J]. 园艺学报, 2001, 28(2): 107-111.
- [11] 李春燕, 张光伦, 曾秀丽, 等. 细胞壁酶活性与甜橙果实品质的相关性研究 [J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(1): 73-76.
- [12] 潘鹏飞, 朱学亮, 潘东明, 等. 低温贮藏对涪州蜜柚汁胞粒化与木质素代谢的影响 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(4): 710-714.
- [13] 丁健. 柑橘果实粒化变异体的遗传背景及其性状形成的机理研究 [D].

武汉: 华中农业大学, 2009.

- [14] 郭金鹏. 涪州蜜柚 BAC 文库末端序列测序及 BLAST2GO 分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [15] 张宪政, 陈凤玉, 王富荣. 植物生理学实验技术 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994: 144-151.
- [16] 陈昆松, 张上隆, 李方, 等. 胡柚果实采后脱水研究 [J]. 园艺学报, 1995(1): 35-39.
- [17] 杨淳彬, 张晓峰. 青藏高原沙棘果汁中可溶性固形物含量的动态变化研究 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 698-701.
- [18] 黄涛江, 张林, 曾安中. 三峡库区奉节县晚熟脐橙果实粒化的原因及对策 [J]. 中国南方果树, 2012, 41(5): 40-42.
- [19] 赵小龙, 李贤良, 刘升球, 等. 茂谷柑果实日灼、粒化原因分析 [J]. 中国南方果树, 2006, 35(2): 5-6.
- [20] 王武, 胡佳羽, 周孝清, 等. W·默科特杂柑冬季不同覆膜处理的落果率与果实品质 [J]. 中国南方果树, 2013, 42(4): 62-64.
- [21] 王向阳, 席鸣芳, 王杰. 植物呼吸抑制剂抑制柑桔脱水的研究 [J]. 食品工业科技, 1997(3): 21-23.
- [22] MCGLOSSON W B. Ethylene and fruit ripening [J]. HortScience, 1985, 20(1): 51-54.
- [23] 陈发河, 吴光斌, 冯作山, 等. 葡萄贮藏过程中落粒与离区酶活性变化及植物生长调节物质的关系 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2): 133-140.
- [24] HUBER D J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening [J]. Hort Rev, 1983, 5: 169-219.