

# 草鱼 EST-SSR 标记及 5 个不同地域群体的遗传结构分析

王解香<sup>①②</sup> 于凌云<sup>①</sup> 白俊杰<sup>①②\*</sup> 樊佳佳<sup>①</sup> 全迎春<sup>①</sup>

① 中国水产科学研究院珠江水产研究所 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室  
广州 510380; ② 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

**摘要:**以草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 脑、肌肉、肝等组织构建 cDNA 文库,经测序获得 unigenes 序列 45 318 个,从中筛选微卫星序列共 5 556 个,据此设计 EST-SSR 引物 118 对,其中 19 对引物能够扩增出带型清晰且多态性较高的谱带。用这 19 个 EST-SSR 标记研究 3 个长江水系群体(石首、监利和长沙)和 2 个珠江水系群体(清远和肇庆)草鱼的遗传结构。结果表明,5 个群体的平均多态信息含量(PIC)为 0.415 4~0.460 4,显示草鱼群体的遗传多样性偏低;平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.415 8~0.501 3,平均期望杂合度为( $H_e$ )0.450 6~0.502 8,其中,长沙群体平均期望杂合度最高,为 0.502 8,监利群体的平均观测杂合度和平均期望杂合度均最低,分别为 0.415 8 和 0.450 6,即长沙群体的遗传多样性最高,监利群体的遗传多样性最低;对数据进行  $F$ -检验,结果表明,群体间的遗传分化程度低。Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验结果表明,5 个群体均一定程度上偏离了平衡;聚类分析显示长沙群体、石首群体与监利群体聚成一支;肇庆群体与清远群体聚成一支,这与草鱼群体的流域分布一致。

**关键词:**草鱼;EST-SSRs;遗传结构;野生群体;遗传多样性

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)05-24-09

## Development of EST-SSR Markers and Analysis of Genetic Diversity in Five Populations of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WANG Jie-Xiang<sup>①②</sup> YU Ling-Yun<sup>①</sup> BAI Jun-Jie<sup>①②\*</sup> FAN Jia-Jia<sup>①</sup> QUAN Ying-Chun<sup>①</sup>

① Pearl River Fisheries Research Institute, Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;

② College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** A total of 5 556 microsatellite sequences were found from ESTs databases (45 318 unigenes) which were constructed from brain, muscle, and liver tissues of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). According to these microsatellite sequences, 118 pairs of primers were designed with Primer Premier 5.0. Nineteen pairs of microsatellite primers could be used to successfully amplify clear and highly polymorphic products by method of PCR. These EST-SSRs primers were employed to detect the genetic diversity of three groups of Grass Carp populations from the Yangtze River System (Shishou, Jianli, Changsha) and two groups from the Pearl River System (Qingyuan, Zhaoqing). A total of 93 polymorphic loci were amplified and 2 to 8 alleles or 4.89 alleles

**基金项目** 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-46-03),佛山市三水科技计划项目,农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金项目,国家高技术研究发展计划项目(No. 2011AA100403);

\* 通讯作者, E-mail: jjbai@163.net;

**第一作者介绍** 王解香,女,硕士研究生;研究方向:生物技术和动物遗传育种;E-mail: wjx0102@yahoo.com.cn。

收稿日期:2011-03-04,修回日期:2011-07-08

on average were detected by each primer. The average polymorphism information content (PIC) ranged from 0.415 4 to 0.460 4, indicating that Grass Carp population had lower genetic diversity; the average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was from 0.415 8 to 0.501 3 and the average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was from 0.450 6 to 0.502 8. Changsha group had the highest mean expected heterozygosity (0.502 8), while Jianli group had the lowest mean expected heterozygosity (0.450 6) and mean observed heterozygosity (0.415 8). These observations indicate that Changsha group has the highest genetic diversity, whereas Jianli group has the lowest;  $F_{st}$  value indicates that the populations are lowly differentiated. After applying Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test, several loci were found to be significantly deviated from HWE in five populations. The dendrogram based on genetic distance ( $D$ ) showed two major clusters according to basin distribution of Grass Carp populations: the stocks from Changsha, Shishou and Jianli, which were sampled from the Yangtze River, were in one cluster; while the other cluster consisted of Zhaoqing and Qingyuan populations sampled from the Pearl River.

**Key words:** Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*; Genetic structure; Nature populations; Genetic diversity

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 具有生长快、养殖成本低等优点,为池塘、湖泊和水库的主要养殖对象,是我国淡水渔业中最重要的养殖品种之一。草鱼分布在亚洲的各大江河水系,在中国除新疆和青藏高原无自然分布外,从黑龙江到西江都有其分布<sup>[1]</sup>,形成了草鱼复杂的遗传背景和丰富的种质资源。近年来,天然水环境的变化和污染使得自然界草鱼种群数量明显下降<sup>[2-4]</sup>,生产中近亲繁殖导致种质退化,已影响到草鱼养殖产业的正常发展。为有效保护和利用这一淡水鱼类资源,有必要利用分子遗传标记,对不同水系的草鱼群体进行遗传结构分析,搞清其遗传背景,为草鱼选育种群的选择奠定基础。目前,已有学者采用同工酶、mtDNA-RFLP、微卫星等检测技术对长江水系草鱼种群的遗传结构进行了研究<sup>[5-8]</sup>,但对不同水系之间草鱼群体遗传结构的研究工作并不多。

表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 中存在一定数量的微卫星或简单重复序列 (EST-SSR),它不仅具有在基因组中均匀分布、共显性和实验重复性好等优点,而且开发成本较低,已成功应用于群体遗传结构分析、QTL 定位和分子标记辅助选择育种等研究领域<sup>[9-11]</sup>。本研究拟从草鱼的 EST 数据库中筛选微卫星分子标记,将其用于长江水系和珠江水系草鱼群体的遗传结构研究,为建立草鱼选

育的基础群体奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 采样时间在 2010 年 5~7 月,监利群体、石首群体和长沙群体分别是长江监利江段、长江石首江段和湘江长沙江段渔获的野生草鱼水花,长至性成熟;清远群体及肇庆群体来自珠江水系清远江段和肇庆江段的草鱼,属于子一代,长至性成熟,共 181 尾。采样地点和数量见表 1。每个样本剪取鳍条,保存于 95% 的乙醇中备用。

表 1 5 个草鱼群体的采样情况表

Table 1 Sampling information of five populations of Grass Carp

群体名称 Group name	样品来源 Sample source	数量(尾) Number (ind)
监利 Jianli	湖北省老河子四大家鱼原种场	26
石首 Shishou	湖北省石首四大家鱼原种场	40
长沙 Changsha	湖南省四大家鱼原种场	36
清远 Qingyuan	广东省清远四大家鱼繁殖场	42
肇庆 Zhaoqing	广东省肇庆四大家鱼繁殖场	37

PCR 常规试剂为上海申能博彩生物科技有限公司产品,其他生化试剂为国产分析纯,均购自广州威佳生物技术有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 草鱼 ESTs 中微卫星序列的查找** 本实验室于 2009 年构建了草鱼脑、肌肉、肝等组织 cDNA 文库,去冗余处理后得到 45 318 条 EST

序列,平均序列长度为 650 bp,用 trf ( tandem repeats finder) 软件从该序列中查找到 5 556 个微卫星。

**1.2.2 微卫星引物设计合成** 选取重复次数在 5 次以上的双碱基重复序列和重复次数在 4 次以上的三碱基或四碱基重复序列,使用引物设计软件 Primer Premier 5.0 进行引物设计,获得 EST-SSR 引物 118 对。引物由英骏生物技术有限公司合成。

**1.2.3 草鱼基因组 DNA 提取** 参照天根离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)说明书介绍的方法提取草鱼鳍条基因组 DNA。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 质量及浓度,DNA 保存于 -20℃ 备用。

**1.2.4 PCR 扩增筛选** PCR 反应总体积为 20

μl,含有 10 × buffer 2.0 μl,MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 0.8 μl;dNTP (10 μmol/L) 0.3 μl;上下游引物 (20 μmol/L) 各 0.5 μl;基因组 DNA 40 ng, Taq 酶(上海申能博彩生物科技有限公司)1 U。PCR 扩增程序为,94℃ 预变性 4 min;94℃ 30 s, 46 ~ 56℃ 30 s,72℃ 30 s,32 个循环;72℃ 再延伸 7 min。PCR 产物用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 10 V/cm 电泳 2 h,0.1% 硝酸银染色,2% 氢氧化钠显色(临用配制,含 0.25 g 无水碳酸钠,2 ml 37% 甲醛)<sup>[12]</sup>,扫描仪成像,Gene Tools 软件对谱带的分子量大小进行估算。

从合成的 118 对草鱼 EST-SSRs 引物中共筛选 19 对扩增稳定、条带清晰且具有多态性的引物,用于草鱼群体的遗传结构分析。其引物信息见表 2。

表 2 19 对微卫星引物序列、等位基因数及退火温度

Table 2 The sequences, alleles of nineteen microsatellite primers and annealing temperature

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	退火温度 Annealing temperature (℃)	核心序列 Core motif	片段大小 Size (bp)	等位 基因数 Number of alleles
23460	F: AAGCCCAAAGCCACAGAA R: GCAGTAGAAGAGTGAAAAGCATC	50	CT9	156 ~ 180	6
44049	F: GCTGCTGCACTCCTAAAACCTC R: TGAAAGGTCCAAAGAAAAGAAC	50	TGTC3	165 ~ 185	3
4703	F: AAGTGAGACTATGCTGATAAAACCG R: ATTGAAACAGATGCCTGCTTG	50	AC10	222 ~ 276	8
2423	F: CTGTGATGGGTAGATTTAGGG R: GCCTGGTGAGTTGGTATGG	50	GT20	201 ~ 218	4
5476	F: GCTAACACTCCTTTACTATCAT R: TTGAAACGCTGATTGAGA	50	ATCT6	298 ~ 343	6
21051-1	F: GGTCTCGTCTTCGCCATCCT R: CCTGCGGTTTGGCTGCTAT	50	TA7	256 ~ 268	3
12886	F: GAGCGACTCCAGTGAGATAA R: CCAGGATGAACGAACAAATA	52	AT10	320 ~ 339	4
40698	F: TCAGCCTTATGCCTTGCT R: GCCACTGAACTGGTAACG	53	GA7	320,324	2
16165	F: TCTAATACTGTGCCTGTTCTA R: CACTTACTTACTGCTTGATTGT	52	AC7	123 ~ 139	4
4218	F: TGTCGCTCAGTCATTCTCC R: GCAAGTATTGTCAACCAAGTGT	50	GT7	87 ~ 120	6
35939	F: TAAGTAACGCTCCTTGAAAA R: GAGTGTCTGTTGCTGCTG	51	AC7	198,202	2
23426	F: AAGGAACAGCATAAACCCGAAAT R: GGAACCAAGCATCTGAAACTG	48	AC10	253 ~ 284	8
28973	F: AGATAAACTGGGGCGGC R: TGGAGACAGGTCGTCAACAC	46	AC14	220 ~ 238	4
784	F: CAGAGTTCGGAGACAAAGAG R: GAATGGTGTTCATGTAAGTGT	45	AC10	91 ~ 118	7
4996	F: TAAGGAAGTGATAGGGACATT R: TAGTTGCTCGTTGTGATGTG	55	AC6	89 ~ 124	5
13118	F: TGATTGCCAAGATTGTTTCG R: ATACAGGGAGGTTATTACGACA	56	AC10	120 ~ 138	4
17329	F: ATTTTCAGTAGTAACCCATCAC R: ACAGGACCAATAAGGAACA	54	AGAT6	149 ~ 168	7
16158	F: GCAGGACTGAGACTGAAGGA R: GAGGTCTTTGCGGTTGTAT	50	ACAG3	216 ~ 224	3
30977	F: AAAATCCCAGTGAGACAATC R: ATCCCAATAATGCCTTGC	50	AC14	214 ~ 234	7

F:正向引物;R:反向引物。F:Forward primer; R:Reverse primer.

### 1.2.5 数据统计与分析

(1)用 POPGEN 32 软件计算有效等位基因数(effective numbers of allele,  $Ne$ )<sup>[13]</sup>, 观测杂合度(observed heterozygosity,  $Ho$ )<sup>[14]</sup>, 期望杂合度(expected heterozygosity,  $He$ )<sup>[14]</sup>, 相对遗传距离(genetic distance,  $D$ )<sup>[15]</sup>, 遗传相似系数(genetic similarity index,  $S$ )<sup>[16]</sup>, 遗传分化指数(genetic differentiation index,  $F_{st}$ )<sup>[17]</sup> 和 Hardy-Weinberg 遗传偏离平衡指数( $d$ )<sup>[18]</sup>。有效等位基因数( $Ne$ ):  $Ne = 1 / \sum P_i$ , 式中,  $P_i$  为每个位点第  $i$  个等位基因的频率; 平均观测杂合度( $Ho$ ):  $Ho = \text{观察到的杂合子数} / \text{观察个体总数}$ ; 平均期望杂合度( $He$ ):  $He = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ , 式中,  $n$  为位点数,  $P_i$  为该位点上第  $i$  个等位基因的频率; 遗传相似系数( $S$ ):  $S_{ij} = N_{ij} / [N_i + N_j + N_{ij}]$ , 式中,  $S_{ij}$  为任意 2 个个体间的遗传相似系数,  $N_{ij}$  为  $i$  个体和  $j$  个体共享位点数,  $N_i$ 、 $N_j$  分别为  $i$  个体和  $j$  个体各自扩增的位点总数; 相对遗传距离( $D$ ):  $D_{ij} = -\ln(S_{ij} / \sqrt{S_i \cdot S_j})$ , 式中,  $S_{ij}$  为两种群间的遗传相似系数,  $S_i$ 、 $S_j$  分别表示种群  $i$  和种群  $j$  的遗传相似系数; 群体间遗传分化指数( $F_{st}$ ):  $1 - F_{st} = (1 - F_{is}) \times (1 - F_{it})$ , 式中,  $F_{is}$ 、 $F_{st}$ 、 $F_{it}$  分别代表群体内近交系数、群体间分化指数和总群体近交系数; Hardy-Weinberg 遗传偏离平衡指数( $d$ ):  $d = (Ho - He) / He$ , 式中,  $Ho$  为该位点的平均观测杂合度,  $He$  为该位点的平均期望杂合度。

(2)多态信息含量(polymorphic information content, PIC)<sup>[19]</sup>,  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j$ , 式中,  $P_i$ 、 $P_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因的频率,  $n$  为等位基因数目。

(3)用 MEGA 4 软件根据群体间的遗传相似性指数和遗传距离, 采用非加权配对算术平均法<sup>[20]</sup> (unweighted pair group method using arithmetic means, UPGMA) 构建 5 个草鱼群体的系统树, 以分析群体间的亲缘关系。

## 2 结果与分析

**2.1 EST-SSRs 引物筛选** 118 对 EST-SSR 引物对 50 尾草鱼样本进行 PCR 扩增, 其中, 87 对引物扩增出单一条带, 12 对引物无扩增产物, 19 对引物能扩增出多态性片段, 多态性引物占所有设计引物的 16.00%。其中双碱基重复序列 15 个, 占 83.16%; 4 个碱基重复序列 4 个, 占 16.84%。双碱基重复中以 (AC)<sub>n</sub> / (GT)<sub>n</sub> 为主, 占 73.33%; (AT)<sub>n</sub> / (AT)<sub>n</sub> 占 13.33%, (CT)<sub>n</sub> / (AG)<sub>n</sub> 占 13.33%。

**2.2 EST-SSRs 标记多态性分析** 应用 19 对微卫星引物对 5 个草鱼群体共 181 尾草鱼样本进行多态性检测, 共获得 93 个等位基因, 每对引物检测到的等位基因数为 2 ~ 8 个, 平均为 4.89 个, 扩增产物片段大小为 87 ~ 339 bp; 其多态信息见表 3。引物 23460 扩增结果见图 1。

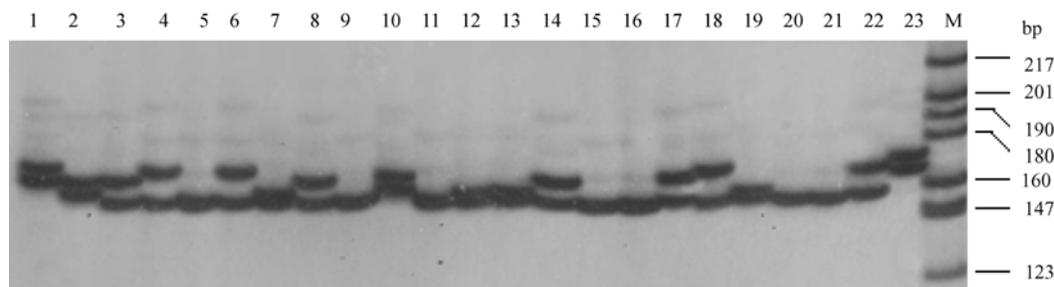


图 1 引物 23460 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR results of *Ctenopharyngodon idella* amplified by primer 23460

1 ~ 23: 长沙草鱼群体; M: ssr Bsu I 分子量标准。

1 ~ 23: Grass Carp population in Changsha; M: ssr Bsu I marker.

表 3 19 个微卫星位点的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of nineteen microsatellite loci

位点 Locus	平均等位基因数 Average allele ( <i>Na</i> )	平均有效等位基因数 Average effective numbers of allele ( <i>Ne</i> )	平均观测杂合度 Average observed heterozygosity ( <i>Ho</i> )	平均期望杂合度 Average expected heterozygosity ( <i>He</i> )	平均多态信息含量 Polymorphic information content (PIC)
23460	6	1.926 3	0.438 9	0.482 2	0.459 5
44049	3	1.999 8	0.455 6	0.501 3	0.380 5
4703	8	3.188 5	0.711 1	0.688 3	0.666 2
2423	4	1.540 2	0.361 1	0.351 7	0.349 7
5476	6	1.481 2	0.266 7	0.325 8	0.322 7
21051-1	3	2.025 4	0.561 1	0.507 7	0.437 8
12886	4	2.324 5	0.533 3	0.571 4	0.513 6
40698	2	1.867 2	0.444 4	0.465 7	0.356 6
16165	4	2.112 6	0.516 7	0.528 1	0.495 3
4218	6	2.428 8	0.583 3	0.589 9	0.587 8
35939	2	1.938 7	0.477 8	0.485 5	0.367 0
23426	8	2.082 9	0.527 8	0.521 4	0.516 3
28973	4	2.117 0	0.527 8	0.529 1	0.436 0
784	7	5.100 4	0.611 1	0.806 2	0.791 2
4996	5	1.524 2	0.316 7	0.344 9	0.307 7
13118	4	1.970 4	0.361 1	0.493 9	0.492 3
17329	7	2.071 9	0.355 6	0.518 8	0.508 2
16158	3	1.595 6	0.372 2	0.374 3	0.372 1
30977	7	2.493 7	0.483 3	0.600 6	0.594 8
平均 Mean	4.894 7	2.199 4	0.468 7	0.509 8	0.471 3

2.3 群体的遗传多样性与哈代-温伯格平衡

群体遗传多样性的统计分析结果见表 4。5 个草鱼群体的平均等位基因数 (*Na*) 为 3.526 3 ~ 4.315 8, 平均有效等位基因数 (*Ne*) 为 1.929 3 ~ 2.139 0, 平均观测杂合度 (*Ho*) 为 0.415 8 ~ 0.501 3, 平均期望杂合度 (*He*) 为 0.450 6 ~ 0.502 8, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.415 4 ~ 0.460 4; 长沙群体平均多态信息含量

和平均期望杂合度最高, 为 0.460 4 和 0.502 8; 监利群体的平均观察杂合度和平均期望杂合度最低, 为 0.415 8 和 0.450 6。通过计算基因型的 *P* 值检验, 5 个草鱼群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离常数均发生了不同程度的偏离, 结果见表 5。在石首群体中, 16165 位点发生显著偏离, 4703、17329 和 30977 位点发生极显著偏离; 在长沙群体中, 23426 位点发生显著偏离, 23460、

表 4 5 个草鱼群体的遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters in five populations of Grass Carp

群体 Populations	平均等位基因数 Average allele ( <i>Na</i> )	平均有效等位基因数 Average effective numbers of allele ( <i>Ne</i> )	平均观测杂合度 Average observed heterozygosity ( <i>Ho</i> )	平均期望杂合度 Average expected heterozygosity ( <i>He</i> )	平均多态信息含量 Polymorphic information content (PIC)
石首 Shishou	4.315 8	1.999 6	0.472 4	0.479 1	0.426 1
长沙 Changsha	4.105 3	2.098 5	0.467 1	0.502 8	0.460 4
肇庆 Zhaoqing	4.263 2	2.074 7	0.459 2	0.495 3	0.454 0
清远 Qingyuan	3.526 3	2.139 0	0.501 3	0.500 1	0.456 2
监利 Jianli	3.684 2	1.929 3	0.415 8	0.450 6	0.415 4

5476、16165、4218、784、4996、17329 和 16158 位点发生极显著偏离;在监利群体中,23426 和 17329 位点发生显著偏离,4218 位点发生极显著偏离;在肇庆群体中,4703、5476 和 23426 位点发生显著偏离,23460 和 13118 位点发生极显著偏离;在清远群体中,23426 和 17329 位点发生显著偏离,4218 位点发生极显著偏离。

**2.4 群体间的  $F_{st}$  值、遗传相似系数与遗传距离** 草鱼群体间的  $F_{st}$  值(表 6)表明,5 个群体间遗传分化程度低 ( $F_{st} < 0.05$ )。依据 Nei<sup>[15]</sup>

计算群体间的遗传距离和遗传相似系数,结果表明,监利群体与清远群体遗传距离最远(0.086 2),遗传相似系数最小(0.917 4),说明两者亲缘关系较远;而长沙群体与石首群体遗传距离最近(0.019 8),遗传相似系数最大(0.980 4),说明两者亲缘关系最近(表 7)。根据群体间的遗传距离矩阵构建 5 个群体的 UPGMA 聚类图(图 2)。可以看出,5 个草鱼群体聚成了两支,长沙群体、监利群体和石首群体聚成一支;肇庆群体和清远群体聚成一支。

表 5 草鱼 5 个群体基因型 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验

Table 5 Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium of genotypes in the five populations of Grass Carp

位点 Locus	石首 Shishou	长沙 Changsha	肇庆 Zhaoqing	清远 Qingyuan	监利 Jianli
23460	0.763 912	0.000 081 **	0.001 094 **	0.002 539 **	0.987 654
44049	0.822 356	0.883 755	0.484 959	0.025 781 *	0.730 070
4703	0.000 048 **	0.387 954	0.011 439 *	0.000 481 **	0.792 137
2423	0.887 893	0.203 434	0.684 929	0.000 106 **	0.958 253
5476	0.037 542	0.000 000 **	0.010 527 *	0.866 905	0.054 012
21051-1	0.891 145	0.618 781	0.109 784	0.000 000 **	0.752 433
12886	0.662 535	0.736 386	0.882 510	0.201 060	0.936 986
40698	0.947 724	0.939 415	0.512 312	0.778 484	0.851 716
16165	0.010 222 *	0.003 874 **	0.891 796	0.321 809	0.616 942
4218	0.765 947	0.004 633 **	0.062 125	0.000 003 **	0.000 000 **
35939	0.732 541	0.732 201	0.172 316	0.201 975	0.108 640
23426	0.323 455	0.013 173 *	0.012 010 *	0.977 212	0.012 171 *
28973	0.702 930	0.183 310	0.700 985	0.172 427	0.453 490
784	0.158 196	0.000 027 **	0.954 553	0.010 581 *	0.353 650
4996	0.469 522	0.000 027 **	0.539 652	0.393 952	0.993 509
13118	0.757 699	0.399 087	0.000 000 **	0.001 894 **	0.070 525
17329	0.002 814 **	0.000 000 **	0.287 716	0.000 337 **	0.042 720 *
16158	0.563 888	0.000 000 **	0.943 198	0.000 659 **	0.303 898
30977	0.000 086 **	0.203 310	0.072 210	0.005 016 **	0.153 520

上标“\*”和“\*\*”分别代表该位点基因型显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

“\*” and “\*\*” respectively represent genotype is significant ( $P < 0.05$ ) and extremely significant deviation ( $P < 0.01$ ) from HWE in this locus.

表 6 5 个草鱼群体间的  $F_{st}$  值

Table 6  $F_{st}$  values among five populations of Grass Carp

群体 Populations	石首 Shishou	长沙 Changsha	肇庆 Zhaoqing	清远 Qingyuan	监利 Jianli
石首 Shishou		0.036 4	0.034 8	0.054 6	0.041 8
长沙 Changsha			0.014 6	0.033 0	0.015 9
肇庆 Zhaoqing				0.027 7	0.019 9
清远 Qingyuan					0.037 3
监利 Jianli					

表 7 5 个草鱼群体遗传距离与遗传相似系数

Table 7 Genetic distance and genetic similarity of five populations of Grass Carp

群体 Populations	石首 Shishou	长沙 Changsha	肇庆 Zhaoqing	清远 Qingyuan	监利 Jianli
石首 Shishou		0.980 4	0.957 1	0.934 0	0.941 7
长沙 Changsha	0.019 8		0.968 3	0.967 0	0.966 1
肇庆 Zhaoqing	0.043 9	0.032 2		0.977 3	0.935 8
清远 Qingyuan	0.068 2	0.033 5	0.023 0		0.917 4
监利 Jianli	0.060 1	0.034 4	0.066 4	0.086 2	

对角线以上为遗传相似系数, 对角线以下为遗传距离。

Numbers above the diagonal are genetic identity and numbers below are genetic distance.

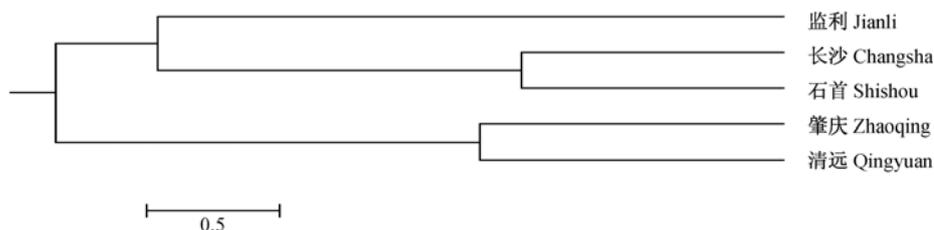


图 2 5 个草鱼群体的聚类分析

Fig. 2 Cluster dendrogram of five populations of Grass Carp

### 3 讨论

**3.1 草鱼 EST-SSRs 标记的筛选** 本研究从草鱼 760 000 个 EST 序列拼接后获得的 45 318 条序列中查找获得 5 556 个微卫星序列, 占整个 ESTs 数据库的 12.26%, 其中 EST-SSRs 中双碱基占有较大的比例(83.16%), 而重复类型又以  $(AC)_n / (GT)_n$  为主, 占 60.00%。这个结论与其他学者所筛选到的微卫星碱基组成类型及比例基本一致, 如 Wang、鲁翠云等<sup>[21-22]</sup> 在鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) ESTs 中筛选出的 EST-SSRs,  $(AC)_n / (GT)_n$  占双碱基重复类型的 67.57%; 一些学者在筛选鲤鱼微卫星中发现双碱基组成的微卫星占有 96.75%,  $(AC)$  所占的比例是  $(CT)$  比例的 7 倍<sup>[23-25]</sup>。这些结论预示, 含有 AC 双碱基重复类型的序列是筛选鱼类微卫星位点重点选择的序列。

EST-SSR 序列主要是鱼类功能基因上所筛选到的序列, 在鱼类进化及生物合成中起到编码氨基酸和蛋白质的重要作用, 其比基因组所受到的选择压力大, 其变异频率偏低、变异类型

也会偏少。本研究草鱼 EST-SSR 标记多态信息含量为 0.415 4 ~ 0.460 4, 为中度多态; 而李欧等<sup>[26]</sup> 所用的草鱼基因组 SSR 标记中, 其 45 个多态性微卫星位点, 34 个位点具有高度多态性, 9 个位点具有中度多态性, 2 个位点具有低度多态性, 其结果表明草鱼基因组 SSR 属于高度多态。本研究表明, 草鱼功能基因组上所筛选到的微卫星标记对草鱼微卫星多态性分析有所影响。

**3.2 群体遗传多样性分析** 遗传杂合度又称基因多样性, 是指微卫星座位为杂合子的比例, 它能较好反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度, 其大小可以反映群体遗传变异的高低, 一般认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数<sup>[27]</sup>。5 个草鱼群体的平均观测杂合度在 0.416 到 0.501 之间, 而平均等位基因数在 3.526 到 4.316 之间(表 4)。根据 DeWoody 等<sup>[28]</sup> 统计 13 种淡水鱼类而得出的平均杂合度为 0.46, 平均等位基因数为 7.5, 可认为本研究中 5 个草鱼群体微卫星等位基因数目较少, 遗传多样性较低, 张四明、谭书贞及吴海防

等<sup>[6-7,29]</sup>分别利用线粒体 DNA 对草鱼群体进行了分析,结果都证实草鱼群体遗传多样性很低。长江和珠江水系草鱼生物量巨大,而且两江中下游许多湖泊也为草型湖泊,这种有效群体基数和生存环境本不应该造成遗传多样性偏低。由于现在很多湖泊都变为季节性通江或不通江,造成草鱼群体迁移受阻,再加上目前人为因素影响和生存环境的恶化都会造成草鱼生物多样性的降低。另外,Luikart 等<sup>[30]</sup>认为对于一些繁殖率高的物种,如昆虫、鱼类、植物等,在某些情况下下一代可能只是由少数个体繁殖得来,这可能产生“隐蔽遗传瓶颈(cryptic bottleneck)”。张四明等<sup>[6]</sup>利用微卫星标记研究草鱼遗传多样性过程中发现,草鱼的遗传变异确实很低并且多个座位严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡,推测草鱼可能在历史上经历了一次遗传瓶颈。5 个草鱼群体遗传多样性偏低也不排除是草鱼“隐蔽遗传瓶颈效应”。

**3.3 群体遗传变异** 根据 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 树,5 个草鱼群体聚成了两支,长沙群体、石首群体与监利群体聚成一支;肇庆群体与清远群体聚成一支,这与石首群体、长沙群体和监利群体属于长江水系群体,而肇庆群体与清远群体属于珠江水系群体的繁育后代有关。薛国雄等<sup>[31]</sup>对黑龙江、长江和珠江水系草鱼的遗传距离进行分析,结果表明长江水系宜昌段的鱼群和太湖水域鱼群遗传距离最小,与珠江种群的遗传距离次之,黑龙江种群与其余三者遗传距离最大。这些结果都证明草鱼遗传距离仍然与草鱼的地理分布情况基本一致。鱼类的遗传变异绝大部分发生在群体内,群体间的遗传分化是非常微弱的。而本研究中长沙群体来自于湘江,属于长江支流,石首群体和监利群体来自长江干流,3 个群体虽属于长江水系但都属于群体间,本研究分析结果显示,长沙群体与石首群体遗传距离最近。根据刘乐和等对葛洲坝水利枢纽兴建后长江中上游鱼类资源状况调查结果,江湖隔绝、围湖造田等原因对草鱼半洄游及产卵繁殖产生了影响<sup>[5,32-33]</sup>,我们推测这种结果有可能与长江江段间兴建水利枢纽、江

湖隔绝等原因造成草鱼迁移受阻有关。

**致谢** 感谢在本论文样品采集过程中湖南省水产研究所、佛山市百容水产种苗有限公司、佛山市三水白金水产种苗有限公司给予的大力支持!

## 参 考 文 献

- [1] Nelson J. Fishes of the World. 3rd ed. New York: Wiley, 1994.
- [2] 渔业简讯. 水产科技情报, 2010, 37(2): 102 - 104.
- [3] 张锡元, 张德春, 杨代淑, 等. 长江鲢遗传多样性的随机扩增多态 DNA 分析. 水产学报, 1999, 23(增刊 1): 7 - 14.
- [4] 李思发, 王强, 陈永乐. 长江、珠江、黑龙江三水系的鲢、鳙、草鱼原种种群的生化遗传结构与变异. 水产学报, 1986, 10(4): 351 - 372.
- [5] 赵金良, 李思发. 长江中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼种群分化的同工酶分析. 水产学报, 1996, 20(2): 104 - 110.
- [6] 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): 132 - 147.
- [7] 谭书贞, 董仕, 边春媛, 等. 长江流域 3 个群体草鱼 mtDNA D-loop 区段的 PCR-PFLP 分析. 南开大学学报: 自然科学版, 2007, 40(3): 106 - 112.
- [8] 廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 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.
- [9] Varshney R K, Sigmund R, Börner A, et al. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. Plant Science, 2005, 168(1): 195 - 202.
- [10] Pérez F, Ortiz J, Zhinaula M, et al. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus biridy*. Marine Biotechnology, 2005, 7(5): 554 - 569.
- [11] Wang H X, Li F H, Xiang J H. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 2005, 249(1/4): 107 - 114.
- [12] 霍金龙, 曾嵘, 潘伟荣, 等. 微卫星 PCR 聚丙烯酰胺凝胶银染法影响因素的分析研究. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 67 - 71.
- [13] Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1975.
- [14] Nei M. The theory of genetic distance and evolution of

- human races. *Journal of Human Genetics*, 1978, 23 (4): 341 - 369.
- [15] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(10): 5269 - 5273.
- [16] Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudaise des Sciences Naturelles*, 1908, 44: 223 - 270.
- [17] 瞿冬艳, 陈仁金, 毛永江, 等. 宁夏牧区主要绵羊品种遗传多样性分析及群体间杂种优势预测. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(1): 1 - 6.
- [18] Salanti G, Loannidis J P A. Hardy-Weinberg equilibrium. *Encyclopedia of Ecology*, 2008, 10(2): 1844 - 1846.
- [19] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314 - 331.
- [20] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona: Arizona State University, Tempe, 2001.
- [21] Wang D, Liao X L, Cheng L, et al. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences. *Aquaculture*, 2007, 271(1/4): 558 - 574.
- [22] 鲁翠云, 全迎春, 李大宇, 等. 用鲤鱼 EST-SSRs 分子标记分析长江黑龙江鲤种群结构. *农业生物技术学报*, 2007, 15(6): 947 - 952.
- [23] Edwards Y J K, Elgar G, Clark M S, et al. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 278(4): 843 - 854.
- [24] 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. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(3): 353 - 362.
- [25] Serapion J, Kucuktas H, Feng J N, et al. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Biotechnology*, 2004, 6(4): 364 - 377.
- [26] 李鸥, 赵莹莹, 郭娜, 等. 草鱼种群 SSR 分析中样本量及标记数量对遗传多度的影响. *动物学研究*, 2009, 30(2): 121 - 130.
- [27] 李莉, 孙振兴, 杨树德, 等. 用微卫星标记分析皱纹盘鲍群体的遗传变异. *遗传*, 2006, 28(12): 1549 - 1554.
- [28] DeWoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 2005, 56(3): 461 - 473.
- [29] 吴海防, 董仕, 单淇, 等. 3 个群体草鱼 mtDNA D-Loop 的 PCR-RFLP 分析. *水产科学*, 2006, 25(4): 185 - 188.
- [30] Luikart G, Sherwin W B, Steele B M, et al. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*, 1998, 7(8): 963 - 974.
- [31] 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.
- [32] 长江四大家鱼产卵场调查队. 葛洲坝水利枢纽工程截流后长江四大家鱼产卵场调查. *水产学报*, 1982, 6(4): 287 - 305.
- [33] 刘乐和, 吴国犀. 葛洲坝水利枢纽兴建后长江中上游鱼类资源状况及增殖途径初探. *水利渔业*, 1992, 55(1): 3 - 7.