

张燕萍,陈文静,汪登强,等. 鄱阳湖水系草鱼野生及增殖放流群体遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):207-211.

鄱阳湖水系草鱼野生及增殖放流群体遗传多样性分析

张燕萍¹, 陈文静¹, 汪登强², 段辛斌², 徐先栋¹, 王昌来¹

(1. 江西省水产科学研究所, 江西南昌 330039; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北武汉 430223)

摘要:选取 13 个微卫星标记组合,建立了 2 个四重 PCR 体系和 1 个五重 PCR 体系,对鄱阳湖水系草鱼野生与增殖放流群体的遗传多样性进行了检测。结果表明:3 个多重 PCR 体系中 13 个微卫星位点共检测到等位基因 194 个,每个位点等位基因数为 10~21 个,平均等位基因 14.92 个,平均有效等位基因数为 7.683 5;野生群体与增殖放流群体草鱼的平均期望杂合度(H_e)为 0.717 2~0.933 9 之间;13 个微卫星位点的 $PIC > 0.5$,均为高度多态位点,平均 PIC 为 0.8266。群体间遗传分化指数(F_{st})及 AMOVA 分析表明,群体间遗传分化不显著,野生群体与增殖放流群体间遗传分化不明显,而且大部分的变异来自于群体内。基于亲缘关系构建的 UPGMA 聚类树表明,亲缘关系最近的赣江与瑞昌两野生群体最先聚到一起,为一类,然后两增殖群体聚为一类。综上所述,鄱阳湖水系野生草鱼及增殖放流草鱼具有较高的遗传多样性,野生群体遗传多样性高于增殖放流群体,但野生群体与增殖放流群体间遗传分化不明显。

关键词:鄱阳湖水系;微卫星;草鱼;增殖放流;遗传多样性

中图分类号: S931.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0207-05

鄱阳湖是长江流域最大的通江湖泊,具有相对完整的水陆相生态系统,也是全国重要淡水渔业基础之地。近年来,由于过度捕捞、非法渔具、污染、涉水工程等多种原因,使得赣江及鄱阳湖渔业资源急剧衰退,四大家鱼资源匮乏,在渔获物中所占的比例较少^[1-2]。为满足赣江流域航运、发电和防洪等水资源综合利用的需求,长江三峡、万安水电站以及在赣江中游建设的峡江水利枢纽等,使得其水流、水文条件发生明显变化,不利于鄱阳湖水系四大家鱼的洄游、刺激产卵和基因交流等,加剧鄱阳湖水系四大家鱼资源的衰退。

江西省自 2002 年以来,在鄱阳湖区、长江江西段以及“五河”进行了大规模四大家鱼 F_1 代苗种增殖放流活动,苗种放流的效果如何,是否会改变鄱阳湖水系及长江自然群体的遗传多样性及遗传结构等,成为人们十分关注的问题。微卫星

(microsatellite)是一类由 2~5 个核苷酸组成的重复单位的重复序列,又称简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)或串联重复序列(short tandem repeat, STR)。微卫星标记以分布广泛、高多态性、共显性遗传、易检测的特点,已被广泛应用于 QTL 定位、个体鉴定、群体遗传学及进化等研究领域。目前,针对长江水系的草鱼群体,廖小林等利用 6 个微卫星标记研究了长江水系 4 个群体草鱼的遗传多样性^[3];张志伟等用 10 个微卫星标记对江苏境内 1 个草鱼野生群体和 2 个养殖群体的遗传多样性进行了分析^[4];张建铭等利用 ISSR 分子标记技术对赣江中游四大家鱼的遗传多样性进行分析^[5]。但是,对鄱阳湖水系增殖放流群体及野生群体草鱼遗传多样性的比较研究还较少。

由于多重 PCR(multiplex PCR)技术具有高效、经济、快捷^[6]等优点,1988 年,Chamberlain 等首次建立这一技术^[7],该技术就被广泛应用于多病毒、细菌高通量快速检测^[8-9]、群体遗传分析^[10]、亲子鉴定^[11]及数量性状基因座位(QTL)的定位^[12]等研究。本试验采用长江水产研究所建立的鲢微卫星多重 PCR 微卫星标记检测技术,对鄱阳湖水系草鱼 2 个野生群体和 2 个增殖放流群体进行研究,通过比较野生和增殖放流群体间遗传多样性差异,研究人工增殖放流对天然水体野生草鱼遗传结构的影响,为合理开展天然水域的人工放

收稿日期:2013-01-07

基金项目:农业部长江中上游渔业资源环境重点野外科学观测试验站项目(编号:YWTZ/1002)。

作者简介:张燕萍(1979—),女,江西吉安人,硕士,助理研究员,主要从事鱼类资源与渔业环境监测以及遗传育种等研究。E-mail: zhangyanpingxie@163.com。

通信作者:汪登强,博士,副研究员,主要研究方向为鱼类遗传多样性及保护。E-mail:wdq@yfi.ac.cn。

[7]王芸,李健,刘淇,等. 5 种中草药对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(26): 8236-8239.

[8]叶建生. 中草药制剂对中国明对虾幼虾生长及表观消化率的影响[J]. 湖南农业科学,2012(11):113-115.

[9]张耀武,蔡冰,陈万光. 复方中草药制剂对黄河鲤鱼生长性能和肌肉品质的影响[J]. 科学养鱼,2012(12):72-73.

[10]汤菊芬,吴灶和,简纪常,等. 复方中草药对吉富罗非鱼生长及肠道菌群的影响[J]. 广东海洋大学学报,2009,29(6):46-49.

[11]王忠民,李治勋,王先科. 鲤鱼健康鱼与暴发性疫病病鱼血清分析[J]. 科学养鱼,2010(11):43.

[12]艾春香,陈立侨,高露姣,等. Vc 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. 台湾海峡,2002,21(4): 431-438.

[13]廖金花,陈巧,林丽蓉,等. 鲍鱼碱性磷酸酶的分离纯化和性质研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2005,44(2):272-275.

[14]王荻,李绍戊,卢彤岩,等. 中药方剂对施氏鲟生长及血液生化指标的影响[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):212-214.

流提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于 2010 年 5 月至 7 月分别在赣江(GC 表示)和瑞昌(RC 表示)随机采集野生草鱼苗样本各 30 余尾,增殖放流草鱼(SC、TC 表示)夏花种苗 50 尾。用 95% 乙醇保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 野生及增殖放流草鱼取其尾鳍约

100 mg,利用传统的酚 - 氯仿法提取草鱼基因组 DNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性,并用核酸蛋白定量仪进行基因组 DNA 纯度检测及浓度测定, -20 ℃ 保存备用。
1.2.2 引物筛选 根据文献[13 - 15]筛选出来 13 个草鱼微卫星标记,这 13 个草鱼微卫星标记均具有高度多态性,扩增产物的片段长度有一定差异,能满足构建多重 PCR 体系的要求,每 1 对引物各有 1 条引物在 5 端加上荧光基团(6 - FAM、TAMRA、HEX),由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 13 个草鱼微卫星位点信息

位点	引物序列(5'→3')	荧光标记	退火温度(℃)	片段大小(bp)
Cid0025	F:ACAAAACCAGTTAAGAACCACAGG;R:TGAAAGGAGCCGAGAGTTGAA	FAM	58	130 ~ 160
Cid0367	F:TTTGCTGATATTTCCACCACTG;R:AATGGGTGAGACTCTCCAATAAT	TAMRA	58	130 ~ 170
Cid0388	F:TGTGCGCTTGGTCTTGCTTTATT;R:TTCCTTCCCATGACGCTCTC	HEX	58	190 ~ 220
Cid 12	F:TGTGTCGCGTCTGGTTAG;R:AGCAGCACCACTGGACAT	FAM	58	220 ~ 240
Cid0327	F:TCAATATCGCTTAAGGCTGATGA;R:ATGTAGTGCGCTGTTGCTCTC	TAMRA	58	250 ~ 320
Cid0276	F:AAATCACCATCAACCACTTCAATC;R:AAATGTTGCCACAGGCTTAGTCT	HEX	58	120 ~ 160
Cid0177	F:AAGCCCTCGAAACAAAAGTTAG;R:CAAGTATGCAGGAGCAGTGTG	FAM	58	200 ~ 240
HLJC115	F:AAATGCCGTCCAGTGAGTCT;R:TCAGCCTGCACATAACAAAGA	HEX	58	240 ~ 300
Cid0037	F:CCCTTAACCCTAATCCTACCC;R:AGCATGCGCAAACATTGA	TAMRA	58	240 ~ 300
Cid0029	F:TTGCGTCTCAAGCAGAAATGACT;R:GAGAGTGCAGCGGCTCAGG	FAM	58	110 ~ 140
Cid0015	F:GTACGTGCCAGCCATTCAGAGAT;R:GTCAGTGCATGTGGTTTGTCTT	HEX	58	200 ~ 240
HLJC116	F:TGGTTGGACAGCAAACAAAG;R:TGAAGGTCTGGCTGATGATG	FAM	58	220 ~ 260
Cid0321	F:AAACCACTTACGCCTATGGAGAGT;R:CAGCGCTGACGAACACTTTTAC	TAMRA	58	200 ~ 240

1.2.3 多重 PCR 组合及扩增 采用多重 PCR 扩增,引物组合见表 2。按照组合(5 对或 4 对)引物同时扩增,PCR 反应体系包括 10 × Buffer (15 mmol/L MgCl₂) 3 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.5 μL, dNTPs (1 mmol/L) 1 μL, Taq DNA 酶 2 U,正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,加适量模板 DNA 1 μL,反应总体积为 25 μL。PCR 扩增条件为 95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,58 ℃ 退火 450 s 和 72 ℃ 延伸 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将条带清晰的 PCR 产物直接送至上海生工生物工程有限公司进行基因分型。

表 2 草鱼微卫星多重 PCR 引物组合

试验组	引物名称	退火温度(℃)
第 1 组(5 重)	Cid0025、Cid0367、Cid0388、Cid12、Cid0327	58
第 2 组(4 重)	Cid0276、Cid0177、Cid0037、HLJC115	58
第 3 组(4 重)	Cid0029、Cid0015、Cid0321、HLJC116	58

1.2.4 微卫星多态性检测 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳抽检后,在 ABI3730XL 测序仪上进行电泳分型。上样前用灭菌的去离子水将 PCR 产物稀释 10 ~ 20 倍,与分子量内标混合后,94 ℃ 变性 5 min,在 ABI3730XL 测序仪上毛细管电泳 2 h,收集荧光信号,形成胶图。应用 GeneMapper4.0 软件进行泳道跟踪校正、数据提取、分子量标准设定和 PCR 产物片段大小的计算。

1.3 数据处理

PopGene32 软件统计各微卫星位点的等位基因数(num-

ber of alleles, N_a)、有效等位基因数(effective number of alleles, N_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、Hardy - Weinberg 平衡 χ^2 检验概率值(Chi - square test value for Hardy - Weinberg equilibrium, P)和遗传偏离指数(Hardy - Weinberg departure, d)、遗传距离(genetic distance, D)、遗传相似系数(genetic identity, I)。多态信息含量(polymorphism information content, PIC)由下列公式计算:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j^2$$

式中: n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 、 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。使用软件 FSTAT2.9.2(基于无限等位基因模型 IAM)对两两群体间的遗传分化统计值 F_{st} 进行量化分析,并由 Benferroni 校正计算显著性。采用 Arlequin 3.11 软件进行群体间遗传变异的 AMOVA 分析。根据遗传距离用 MEGA 4.0 软件,采用 UPGMA 方法构建 4 个群体的 UPMGA 聚类图。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点遗传多样性

微卫星位点的遗传多样性参数见表 3。利用 ABI3730XL 测序仪检测,13 个位点产生的等位基因数为 10 ~ 21 个,平均为 14.92;有效等位基因数为 3.536 5 ~ 11.444 2,平均为 7.683 5。各位点的观测杂合度为 0.664 1 ~ 0.907 8,平均为 0.807 4;期望杂合度为 0.717 2 ~ 0.933 9,平均为 0.842 9。所有位点的 $PIC > 0.5$,均表现为高度多态,平均 PIC

表 3 微卫星位点的遗传多样性参数

位点	等位 基因数	有效等位 基因数	观测 杂合度	期望 杂合度	多态信 息含量
Cid0025	10	4.900 4	0.722 2	0.795 9	0.767 8
Cid0367	13	3.827 4	0.721 4	0.738 7	0.720 3
Cid0388	17	10.028 1	0.878 6	0.900 3	0.892 1
Cid 12	13	7.416 9	0.907 8	0.8652	0.851 2
Cid0327	17	11.444 2	0.865 7	0.912 6	0.906 3
Cid0276	16	9.224 5	0.884 1	0.891 6	0.883 2
Cid0177	12	4.836 3	0.748 2	0.793 2	0.764
HLJC115	21	1563.12	0.797 1	0.933 9	0.929 9
Cid0037	17	11.283 6	0.881 0	0.911 4	0.904 8
Cid0029	11	3.536 5	0.750 0	0.717 2	0.678 4
Cid0015	14	5.559 5	0.851 2	0.820 1	0.799 2
HLJC116	18	7.281 9	0.824 8	0.862 7	0.850 2
Cid0321	15	5.419 8	0.664 1	0.815 5	0.797 8
平均	14.92	7.683 5	0.807 4	0.842 9	0.826 6

为 0.826 6。

2.2 遗传多样性

4 个草鱼群体遗传多样性参数见表 4。每个群体产生等位基因数为 10.461 5~13.307 7,有效等位基因数为 6.028 6~6.816 1,其中,赣江野生群体产生的等位基因最多,平均为 13.307 7,长江瑞昌野生群体产生的等位基因数最少,为 10.461 5。各群体的平均观测杂合度为 0.788 2~0.819 5,平均期望杂合度为 0.805 7~0.824 0,其中,长江瑞昌野生群体的平均期望杂合度最高,为 0.824 0,增殖放流群体 SC 的平均期望杂合度最低,为 0.805 7。

表 4 野生和增殖放流草鱼群体遗传多样性参数

草鱼群体	等位 基因数	有效等位 基因数	观测杂合度	期望杂合度
GC	13.307 7	6.816 1	0.819 5	0.819 5
RC	10.461 5	6.297 8	0.788 2	0.824 0
SC	10.615 4	6.028 6	0.808 4	0.805 7
TC	11.538 5	6.744 2	0.813 0	0.820 3

2.3 群体间遗传分化

从 AMOVA 分析结果(表 5)可以看出,在总变异中,5% 的变异显著归因于草鱼群体间的变异,野生群体与增殖群体内存在极显著的遗传分化($P<0.01$)。

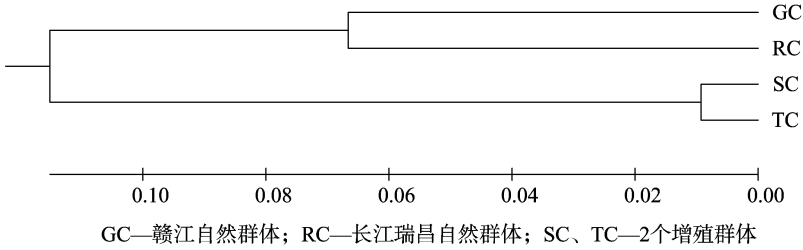


图1 基于标准遗传距离的自然群体与增殖草鱼群体UPGMA聚类

2.5 Hardy - Weinberg 平衡分析

通过基因型的 P 值检验,鄱阳湖水系野生群体、增殖放流群体草鱼的 Hardy - Weinberg 平衡均发生了不同程度的偏离,13 个微卫星位点 Hardy - Weinberg 平衡 χ^2 检验概率值 P 及遗传偏离指数 d 值见表 8。52 个群体位点组合中(4 个群

表 5 鄱阳湖水系野生和增殖放流草鱼 4 个群体基于 13 个微卫星位点的分子变异

变异来源	自由度	平方和	方差分量	变异百分率 (%)	P 值
群体间	3	99.611	0.583	5	≥ 0.05
群体内	140	1709.917	12.214	95	$< 0.01^{**}$
总计	143	1809.528	12.797		

注:“*”表示在 0.01 水平上显著。

群体间成对 F_{st} 值(表 6)表明,长江瑞昌野生 - 增殖(TC)群体的分歧最大,为 0.026 9,其次是增殖放流群体 SC,为 0.022 6,赣江 - 长江瑞昌野生群体分歧最小,为 0.013 4,平均为 0.020 3,且 F_{st} 值均达到显著水平($P<0.05$)。

表 6 草鱼 4 个群体间的遗传分化指数(F_{st})

群体	F_{st}		
	GC	RC	SC
RC	0.013 4*		
SC	0.020 3*	0.022 6*	
TC	0.019 7*	0.026 9*	0.019 1*

注:“*”表示经连续性 Bonferroni 校正后 F_{st} 值显著性($\alpha=0.05$)。

2.4 遗传距离及系统发生树

利用 PopGene32 软件计算了野生群体与增殖群体间的 Nei 氏遗传距离和相似系数(表 7),长江瑞昌野生群体与增殖群体间的遗传相似系数最小,为 0.744 9,遗传距离值最大,为 0.294 5;长江瑞昌野生群体与赣江野生群体间遗传相似系数最大,为 0.875 3,遗传距离值最小,为 0.133 2。根据群体间遗传距离采用 UPGMA 方法对 4 个群体进行聚类分析(图 1)。从图 1 看出,4 个群体可以分为 2 类。遗传距离最近的赣江与瑞昌野生群体最先聚到一起,为一类,然后 2 个增殖群体聚为一类。

表 7 野生草鱼和增殖草鱼的遗传相似系数(上三角)和遗传距离(下三角)

群体	GC	RC	SC	TC
GC	*****	0.875 3	0.820 9	0.816 8
RC	0.133 2	*****	0.797 2	0.744 9
SC	0.197 4	0.226 6	*****	0.831 1
TC	0.202 3	0.294 5	0.185 0	*****

体 \times 13 个位点),符合 Hardy - Weinberg 平衡($P>0.05$)的群体位点组合有 28 个,占总数的 53.8%,其中,赣江野生群体 9 个位点,长江瑞昌野生群体 7 个位点,2 个增殖群体均 6 个位点。剩余 24 个群体位点组合检验为显著偏离($P<0.05$),占总数的 46.2%。52 个群体位点组合中,有 22 个群体位点组

表 8 Hardy - Wweinberg 平衡 χ^2 检验概率值及遗传偏离指数

位点	GC		RC		SC		TC	
	<i>P</i>	<i>d</i>	<i>P</i>	<i>d</i>	<i>P</i>	<i>d</i>	<i>P</i>	<i>d</i>
cid0025	0.940	0.006 3	0.541	-0.105 2	0.000 **	-0.100 5	0.847	-0.040 9
cid0367	1.000	-0.072 8	0.239	-0.079 1	0.000 **	-0.036 3	0.865	0.166 4
cid0388	0.533	-0.015 8	0.370	0.069 0	0.167	-0.111 8	0.005 **	0.096 5
cid12	0.009 **	-0.019 5	0.231	0.059 3	0.157	0.149 3	0.632	0.136 9
cid0327	0.022 *	-0.0506	0.048 *	-0.1031	0.000 **	0.052 2	0.476	-0.015 9
cid0276	0.510	0.083 7	0.001 **	-0.104 9	0.812	0.085 3	0.028 *	-0.017 3
cid0177	0.198	-0.039 1	0.017 *	-0.1272	0.202	0.089 6	0.177	-0.074 3
cid0037	0.378	0.051 6	0.000 **	-0.017 4	0.003 **	0.031 3	0.236	-0.026 1
HLJC115	0.661	-0.041 2	0.061	-0.013 9	0.000 **	-0.154 0	0.002 **	-0.3029
cid0029	0.002 **	0.255 8	0.000 **	0.016 4	0.000 **	0.105 0	0.015 *	0.038 5
cid0015	0.850	0.088 0	0.057	0.017 4	0.119	-0.015 5	0.000 **	0.114 1
cid0321	0.000 **	-0.185 5	0.259	-0.185 4	0.000 **	-0.1144	0.000 **	-0.193 7
HLJC116	0.213	-0.027 0	0.000 **	-0.140 7	0.241	0.087 4	0.000 **	0.020 2

注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

合 $d > 0$, 表现杂合子过剩, 其余全部表现为杂合子缺失 ($d < 0$)。

3 讨论

3.1 鄱阳湖水系自然群体与增殖群体的遗传多样性

多态信息含量是群体内遗传变异的量度, 反映微卫星位点所提供的遗传信息容量的指标。依据 Botstein 等的划分标准: 当 $PIC > 0.5$ 时, 该位点为高度多态位点; $0.25 < PIC \leq 0.5$ 时, 为中度多态性位点; $PIC \leq 0.25$ 时, 为低度多态位点^[16], 本研究 13 个位点的多态信息含量范围为 0.678 4 ~ 0.929 9, 均表现为高度多态性, 适合用于草鱼群体的遗传多样性评估。

杂合度又称基因多样性, 是指微卫星座位为杂合子的比例, 能较好反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度, 大小可以反映群体遗传变异的高低, 现普遍认为遗传杂合度是度量基因多样性程度的优良指标^[17]。群体平均基因杂合度表示在被检测位点上群体中杂合子的频率, 它是衡量群体杂合程度的指标。群体平均基因杂合度越低, 该群体的遗传一致性越高, 即群体的遗传多样性越低。本研究采用微卫星标记对鄱阳湖水系草鱼自然群体与增殖群体遗传结构进行分析, 13 个位点在赣江、长江自然群体以及增殖群体中的平均观测杂合度为 0.807 3; 平均期望杂合度为 0.817 4。根据期望杂合度大小, 鄱阳湖水系自然群体与增殖群体遗传多样性由高到低依次为: 长江瑞昌 (0.824 0) > 赣江 (0.819 5) > 增殖群体 TC (0.820 3) > 增殖群体 SC (0.805 7)。野生和增殖群体的平均基因杂合度均在 0.7 以上, 杂合度较高, 说明鄱阳湖水系草鱼遗传多样性比较丰富, 野生群体遗传多样性高于增殖放流群体。

3.2 增殖放流对野生群体遗传效果的影响

群体间遗传分化指数 F_{st} 是衡量群体间遗传差异的主要指标。Wright 认为 F_{st} 值在 0 ~ 0.05 之间, 群体分化较弱; 在 0.05 ~ 0.15 之间群体分化中等; 0.15 ~ 0.25 之间, 表示群体遗传分化较大; 当 F_{st} 值大于 0.25 时, 表示分化极大^[18]。从鄱阳湖水系野生群体与增殖群体间 F_{st} 来看, 群体间 F_{st} 值介

于 0.013 4 ~ 0.026 9 之间, 都显著偏离数值 0 ($P < 0.05$), 但均小于 0.05, 表明野生群体与增殖群体间并没有产生明显的遗传分化。通过 AMOVA 分析, 结果表明, 鄱阳湖水系野生群体与增殖群体的总遗传变异 5% 来源于群体间差异 ($P < 0.05$), 大部分的变异来自于群体内, 与 F_{st} 分析结果一致。主要是因为增殖放流群体来源于野生草鱼亲本繁殖的 F_1 代。本研究结果与周盼等基于 26 个微卫星标记对三江水系草鱼遗传多样性分析结果^[19]一致, 表明长江流域草鱼的遗传变异均发生在种群内而非种群间。廖小林等的微卫星研究结果^[3]也显示, 长江水系草鱼的遗传分化很微弱, 表明草鱼的主要遗传变异来自群体内而非群体间, 所以增殖群体的放流对野生群体的遗传变化影响不大。

3.3 群体间的亲缘关系

遗传相似指数和遗传距离是衡量群体间亲缘关系的重要指标。GC 和 RC 群体间的遗传相似系数最大, 为 0.875 3, 遗传距离最小, 为 0.133 2, 说明赣江与长江瑞昌野生草鱼群体间的遗传差异较小, 群体分化时间不长; 相反, 与增殖放流草鱼群体间的遗传差异较大, 群体分化时间较长。鄱阳湖位于长江中下游交界处南岸, 是长江流域最大的通江湖泊, 也是我国第一大淡水湖。鄱阳湖汇集赣、抚、信、饶、修等“五河”之水, 鄱阳湖承纳赣、抚、信、饶、修五河来水, 经调蓄后由湖口注入长江^[20]。该湖及支流内的野生草鱼群体均来自长江水系, 所以赣江群体和长江瑞昌群体间的亲缘关系比较近。根据 Nei 氏遗传距离构建的 UPGMA 树, 野生群体与增殖 4 个草鱼群体聚成了 2 支, 其中赣江与长江瑞昌 2 个野生群体最先聚到一起为一类, 2 个增殖群体聚为一类。

3.4 Hardy - Weinberg 平衡

常青等研究表明, 当群体处于 Hardy - Weinberg 平衡时, 各等位基因的分布频率应该是相对稳定, 观察杂合度和期望杂合度之间没有显著的差异^[21]。Hardy - Weinberg 平衡遗传偏离指数 (d) 亦称 F 固定指数 (F), 反映了 H_o 和 H_e 两者间的平衡关系, d 越接近 0, 基因型的分布越接近于平衡状态, d 为正时反映杂合子过剩, d 为负时则处于杂合子缺失状态。在 52 个群体组合中 (4 个群体 \times 13 个位点), 有 24 个群体位

点组合检测为显著偏离 Hardy - Weinberg 平衡, 占总数的 46.2%, 这些偏离平衡的位点中 $d < 0$ 的有 15 个, 占 68.2%, 说明引起鄱阳湖水系草鱼群体偏离 Hardy - Weinberg 平衡的主要原因是杂合子缺失; 这当中有 9 个位点的 d 值大于 0, 占 37.5%, 说明杂合子过剩可能也是偏离平衡的重要原因之一。鄱阳湖水系草鱼野生群体与增殖群体部分微卫星位点偏离 Hardy - Weinberg 平衡, 可能是由于以下几个原因造成: (1) 本研究每个群体 36 个的样本数量不足够代表实际群体。(2) 与无效等位基因丢失有关。用微卫星分子标记对群体进行遗传分析中, 存在无效等位基因而被忽略, 将杂合子计数为纯合子, 就会在结果中产生纯合子过剩, 影响 Hardy - Weinberg 平衡。(3) 与稀有等位基因丢失有关。有些群体的杂合度很高, 但某些位点上的稀有等位基因可能丢失, 造成平衡显著偏离。

利用微卫星得出的遗传距离可反映分化时间的长短, 客观反映了品种间的遗传变异和分化^[19,22]。本试验利用微卫星标记研究了鄱阳湖水系草鱼野生群体与增殖放流群体遗传多样性及遗传结构, 结果表明, 4 个群体具有较高的遗传多样性, 群体间存在低等程度的分化, 本研究所选用的微卫星位点平均多态信息含量均在 0.6 以上, 为高度多态位点, 适于种质资源的鉴定研究。研究结果可为增殖放流效果评估工作提供重要的背景资料, 同时也为鄱阳湖草鱼种质资源的保护和合理利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 黄晓平, 龚雁. 鄱阳湖渔业资源现状与养护对策研究[J]. 江西水产科技, 2007(4): 2-6.
- [2] 张建铭, 吴志强, 胡茂林. 赣江峡江段四大家鱼资源现状的研究[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(1): 34-37.
- [3] 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[J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 113-119.
- [4] 张志伟, 曹哲明, 杨弘, 等. 草鱼野生和养殖群体间遗传变异的微卫星分析[J]. 动物学研究, 2006, 27(2): 189-196.
- [5] 张建铭, 吴志强, 胡茂林, 等. 赣江中游四大家鱼遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(5): 69-73.
- [6] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. Optimization of PCRS [M]//PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 3-13.
- [7] Chambercian J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucl Acids Res, 1988, 16: 1141-1156.
- [8] Ponce M R, Robles P, Micol J L. High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Gen Genet, 1999, 261: 408-415.
- [9] Rosenfield S I, Jaykus L A. A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of food borne viruses [J]. J Food Prot, 1999, 62(10): 1210-1214.
- [10] Yutao L, Wongprasert K, Shekhar M, et al. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations [J]. Aquaculture, 2010, 266(1/2/3/4): 279-288.
- [11] 苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定微卫星多重 PCR 技术建立及应用 [J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(1/2): 97-106.
- [12] 邹浪萍, 杨燕, 褚嘉祐, 等. 多重 PCR 检测 *CSF1PO*, *TPOX* 和 *TH01* 基因座在中国汉族中的多态性 [J]. 遗传学报, 1998, 25(3): 199-204.
- [13] Guo S S, Zou G W, Yang G. Development of microsatellite DNA markers of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their cross-species application in black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. Conserv Genet, 2009, 10(5): 1515-1519.
- [14] Li O, Zhao Y Y, Zhang Y, et al. Twenty-five polymorphic microsatellite markers from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Animal Genetics, 2009, 40(6): 1001-1005.
- [15] Xia J H, Liu F, Zhu Z Y, et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 135.
- [16] 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 genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [17] Balestre M, Von Pinho R G, Souza J C, et al. Potential of maize single-cross hybrids for extraction of inbred lines using the mean components and mixed models with microsatellite marker information [J]. Genetics and Molecular Research, 2008, 7(4): 1106-1118.
- [18] Wright S. The genetical structure of population [J]. Animals Eugenics, 1951, 15: 323-324.
- [19] 周盼, 张研, 徐鹏, 等. 基于 26 个微卫星标记的三江水系草鱼遗传多样性分析 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1011-1020.
- [20] 鄱阳湖研究编委会. 鄱阳湖研究 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- [21] 常青, 曹发华, 朱立峰, 等. 长江下游地区夜鹭种群微卫星变异及遗传多样性 [J]. 动物学报, 2005, 51(4): 657-663.
- [22] Crawford A M, Littlejohn R P. The use of DNA markers in deciding conservation priorities in sheep and other livestock [J]. Anim Genet Res Inform, 1998, 23: 21-26.