

应用微卫星多态分析四个鲤鱼群体的遗传多样性

全迎春^{1,2}, 孙效文^{1,*}, 梁利群¹

(1. 黑龙江水产研究所 北方鱼类生物工程育种重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 选择 12 个斑马鱼功能基因的微卫星标记和 12 个鲤鱼微卫星标记, 检测黑龙江鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)、散鳞镜鲤 (*C. carpio*)、荷包红鲤抗寒品系 (*C. carpio* var. *wuyuanensis*)、松浦鲤 (*C. carpio* Songpu carp) 的群体遗传多样性。共检测到 3 882 个扩增片段, 长度为 126~489 bp, 在群体间扩增出 1~5 个等位基因不等, 共计 59 个等位基因, 平均等位基因 2.46 个。数据经 PHYLIP V3.6 软件估算和 MEGA3 软件作图, 确立 4 个群体间的亲缘关系。并应用 Bootstrap 检验估计系统树中节点的自引导值, 并进行了系统发生分析。结果表明: ① 4 个群体检测的有效等位基因数都在 55 个以上, 平均观测杂合度为 0.36~0.43, 平均期望杂合度为 0.49~0.53, 平均多态信息含量为 0.21~0.25, 说明这几个群体多态性属于中度偏高水平, 遗传多样性较高; ② 群体间相似系数都在 0.84 以上, 遗传距离较近, 为 0.067~0.170, 与前人研究结果一致。聚类分析显示, 松浦鲤与散鳞镜鲤亲缘关系最近, 荷包红鲤抗寒品系与它们的亲缘关系较黑龙江鲤更近; ③ 在 3 个斑马鱼功能基因相关的微卫星位点上, 黑龙江鲤缺失特异扩增条带, 这可能与几种鱼类的育成史有关。

关键词: 鲤鱼; 微卫星; 群体多样性; 分子标记

中图分类号: Q959.468 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2005) 06–0595–08

Microsatellite Variation Among Four Breeding Populations of Common Carps

QUAN Ying-chun^{1,2}, SUN Xiao-wen^{1,*}, LIANG Li-qun¹

(1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Using microsatellite markers we determined polymorphism of genomic DNA and classification in four important cultivation species: Common carp (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel), Scatter scaled mirror carp (*C. carpio*), Frigid-resistant strain of Purse red carp (*C. carpio* var. *wuyuanensis*) and Songpu carp (*C. carpio* Songpu carp). Amplifications with 24 pairs of primers gave a total of 3 882 fragments ranging from 126 bp to 489 bp in the 4 populations, which included 12 pairs of microsatellites designed according to zebrafish function gene sequences and 12 pairs of microsatellites isolated from common carp. 1–5 alleles per locus in 4 species were amplified, and there were 59 alleles in all populations except common carp which had only 21 loci and 55 alleles. The average number of alleles was 2.46. Additionally, a clustering analysis was made based on the results of the PHYLIP software package (version 3.6) and phylogenetic trees were constructed by MEGA3. The bootstrap values were evaluated for each crunode of the dendrogram by means of 1 000 reiterations of the bootstrap test using the Maximum Likelihood method, the Neighbor-Joining method and the UPGMA method. With these methods we made three observations. (1) The level of genetic variability is relatively high in all populations. Observing value of mean heterozygosity varies from 36.43% to 43.79% and expected value of mean heterozygosity varies from 49.49% to 53.29%. All populations show significant heterozygote deficiencies. (2) The genetic similarity indexes are all above 0.84, indicating closeness of their genetic relationship. The genetic distances are small, ranging from 0.067–0.170. The phylogenetic tree shows that Songpu carp and Scatter scaled mirror

* 收稿日期: 2005–07–02; 接受日期: 2005–10–14

基金项目: 国家重大基础研究计划资助项目 (2004CB117405)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: sunxw2002@163.com, 男, 吉林人, 研究员, 博士生导师, 从事水产动物基因工程育种研究, Tel: 0451–84862646

第一作者简介: 全迎春 (1981–), 女, 湖北人, 硕士研究生, E-mail: quan_928@163.com

carp are the nearest in relationship and Frigid-resistant strain of Purse red carp is better correlated with them than the Common carp. (3) There is no aim fragment amplified in 3 loci of zebrafish function gene microsatellites in the population of common carp, which may mean that the flanking sequence of the microsatellites have changed while the PCR primers were designed according to them or the genomes of common carp have lost these function genes or loci. More research is needed to explore the physiological mechanism and biochemical process. In conclusion, these 24 microsatellite markers can be used for the evaluation of genetic diversity in carps. Three microsatellite markers reveal polymorphism between the common carp and the other three carps, and can be used to distinguish them.

Key words: Common carp; Microsatellite; Population variety; Molecular marker

鲤鱼是我国境内分布范围最广的重要淡水经济鱼类之一。其养殖历史悠久,养殖产量在水产养殖业中占相当大的比重,因而对其丰富的资源的遗传研究和多样性保护十分必要。微卫星 (microsatellite) 作为近年来发展迅速、应用广泛的分子标记之一,具有很多其他同类研究方法所不具有的优点,在鲤鱼的遗传与育种方面有很大的应用空间。目前,国内外已有一些应用微卫星进行鲤鱼相关研究的报道,如 Du et al (2000) 报道微卫星分析 3 个鲤鱼群体的聚类结果与其品系选育过程一致; Aliah et al (1999) 用微卫星研究锦鲤家系的遗传变异,仅发现 2 个多态性较高的标记; Liu et al (2003) 则用微卫星来鉴定锦鲤人工雌核发育系的基因多样性,并证明锦鲤基因高度杂合;另外还以该方法检测人工构建的锦鲤纯系 (Liu et al, 2002)。

黑龙江鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)、散鳞镜鲤 (*C. carpio*)、荷包红鲤抗寒品系 (*C. carpio* var. *wuyuanensis*) 和松浦鲤 (*C. carpio* Songpu carp) 都是我国较重要的鲤鱼养殖品种 (系)。对于它们的遗传变异情况的研究,有利于其资源的鉴定、保护和利用,但迄今未见有关研究报道。本文针对这一情况,选取了 24 个微卫星标记作为分析这 4 个鲤鱼群体遗传多样性的遗传标记,对其等位基因频率数据进行统计分析,以期对鲤鱼群体的遗传结构特征、种群历史及遗传资源的保护提供相关信息和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 实验所用鲤鱼群体均采自黑龙江水产研究所,其中黑龙江鲤 31 尾,原产地为黑龙江抚远江段;散鳞镜鲤 30 尾,从原苏联镜鲤和镜鲤后代中选育出;荷包红鲤抗寒品系 31 尾,为原产自江西婺源荷包红鲤,经黑龙江水产研究所进

行抗寒选育所得优良品系;松浦鲤 31 尾,亦为黑龙江水产研究所选育。

1.1.2 引物与试剂 微卫星引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,生化试剂均购自美国 Promega 公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 高分子量基因组 DNA 的提取和纯化 参考《分子克隆》(Sambrook et al, 2002) 进行高分子量基因组 DNA 的提取和纯化。

1.2.2 斑马鱼功能基因的微卫星分子标记制备 从 20 对斑马鱼功能基因微卫星引物中筛选出 12 对斑马鱼微卫星引物。先从 GenBank 中检索得到斑马鱼功能基因序列,用 TRF 软件 (Tandem Repeats Finder, <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/satellites.html>) 查找其中包含的微卫星序列;根据其两端保守的侧翼序列用 Primer 5.0 软件设计引物。20 对引物在斑马鱼基因组中有 19 对能扩增出清晰的特异条带,将其应用于鲤鱼群体研究,最终筛选出 12 对用于鲤鱼群体的多样性分析,其序列情况见表 1。

1.2.3 鲤鱼微卫星分子标记制备 用磁珠富集法获得鲤鱼微卫星序列 (Sun et al, 2005),再设计、筛选引物 (方法同 1.2.2),选出 12 对用于鲤鱼群体的多样性分析,引物信息见表 2。

1.2.4 PCR 反应程序 PCR 扩增反应总体积为 25 μ L,反应参考 Chang et al (2004) 的方法进行: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 ~ 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 总计 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.5 扩增产物检测 PCR 扩增反应产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 200 V 电泳 2 h, Gold View 染色 (上海赛百盛基因技术有限公司), 溴酚蓝为上样液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖水溶液), GDS 8000 凝胶成像仪 (UVP 公司) 记录电泳结果, Gel works 软件包 (3.0 版本) 分析每个扩增条带的分

表 1 斑马鱼功能基因相关微卫星分子标记

Tab. 1 Characterization of microsatellites isolated from zebrafish function genes

位点 Locus	基因及功能 Gene (Accession no.) & function	重复序列 Repetitive sequence	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)
HLJZ01	NM_199978_1755 Growth arrest specific 6	(CA) ₁₀	F : ccactgagcgggttcctat R : ctgttatggcggttgggt	178 – 230	52
HLJZ02	CK018233 Laminin, gamma 1	(AT) ₁₇	F : taactcagccagccacct R : cattacgcattctecatcc	211 – 251	52
HLJZ04	CV488620 Inhibitor of growth family, member 3	(CA) ₂₂	F : tgeccatctgctccata R : tccatgcatcagggtgt	208	56
HLJZ05	AF006488 DeltaB	(CA) ₈ (ATGA) ₆	F : ccctgctgggcaagagt R : atggcгааaggccaatcc	233	56
HLJZ09	CK681632 Neuropilin 2b	(CA) ₁₉	F : tgctagactccaggaaag R : attgggcacagtgtaaaa	157 – 226	52
HLJZ12	AI545263 Early growth response 2b	(GT) ₁₂	F : gcagatcatcccaggagt R : gctggagtaggctaagtcg	194 – 209	50
HLJZ13	CK678632 Fibroblast growth factor receptor 2	(GAA) ₇	F : caggagtctgcgtttcc R : aataactcgttgggcttt	213 – 311	50
HLJZ15	AB026980 Odd Oz/ten-m homolog 4	(ATG) ₅	F : caaggctcgtcttattca R : cgtctatccagcgtttct	268	53
HLJZ16	CO928452 ; Chymotrypsin activity ; negative regulation of blood coagulation	(TCTTC) ₁₀	F : caagatgcgtctgggttag R : aatgagcaggagtaggc	138 – 199	53
HLJZ20	AI558617 ; Igfbp1 insulin-like growth factor binding protein 1	(TAT) ₁₄	F : ccttcaggtcgttttgt R : agcggtgctgcctctact	220	54
HLJZ22	BM859962 ; Hepatoma-derived growth factor, related protein 2	(GGA) ₅	F : aggcggagcagtaaacact R : tggtttgggtttccttgc	409 – 489	55
HLJZ23	CN331068 ; Associated with tumor suppression, cell growth, differentiation, development and apoptosis ; ribosomal	(CA) ₁₁ (CA) ₆	F : aggcggagcagtaaacact R : agggcaggccacatgagaa	179 – 188	53

表 2 鲤鱼微卫星分子标记

Tab. 2 Characterization of common carp microsatellites

位点 Locus	重复序列 Repetitive sequence	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)	位点 Locus	重复序列 Repetitive sequence	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)
HLJ019	(CA) ₂₆	F : actgctggctcaggaaca R : agagcaaagatggtagctc	190 – 226	53	HLJ046	(GT) ₁₄	F : aacctgaactcacaaac R : caccgaaactgagaagac	229 – 269	53
HLJ030	(GT) ₁₃	F : aagtattcgtcctgtcgg R : ggctcttggcttgtttat	288 – 327	53	HLJ058	(CA) ₂₁	F : cagatggcagacaggtaa R : gagcaagtgaggaacag	300 – 361	53
HLJ037	(CA) ₁₄	F : cgtggaggcataagggat R : acgggagcgtacagaaat	126 – 179	53	HLJ076	(GT) ₂₃	F : gaatgtcatcgggttcac R : tatlttgcgtgggtgtctc	145 – 168	53
HLJ038	(CA) ₄₁	F : cacagaacgcactcatgaa R : tgtaaacccttaacctcc	243 – 338	53	HLJ133	(GT) ₂₅	F : aaggcggggttatctcac R : cacaggtatcccatcagt	297 – 341	52
HLJ041	(CA) ₂₄	F : agaccaccgcagtaacaa R : gactcactcagcaccaga	250 – 300	53	HLJ163	(CA) ₄₅	F : ggggcagcagaaaaacagt R : cccactcaggaagacag	198 – 266	52
HLJ044	(CA) ₂₈	F : gtacagcgtgacagcatt R : aagttcatcgggtgtctc	259 – 333	53	HLJ190	(CA) ₁₇	F : ttattgttcagagggttcg R : cctgtcttcatccgtta	292 – 319	52

子量与产物量的差异性。

1.2.6 统计指标 微卫星是共显性遗传，可从琼脂糖电泳图上直接判断出个体的基因型，计算出各个群体各个位点的等位基因频率（allele frequency， P ），即一个群体中某一基因占其等位基因的相对比率；平均观测杂合度（observing value of mean heterozygosity， H_o ），即实际观测到的杂合子在样本中所占比例的平均值；平均期望杂合度（expected

value of mean heterozygosity, H_e) ; 有效等位基因数 (effective numbers of allele, N_e) ; 平均多态信息含量 (average polymorphism information content, PIC) ; 遗传相似系数 (genetic similarity index, I) ; 群体间遗传距离 (genetic distance, D_s) (Nei, 1972)。公式如下 :

期望杂合度 : $h_i = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$;

平均期望杂合度 : $H_e = \sum_{i=1}^r h_i / r$;

某位点的有效等位基因数 : $N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$

多态信息含量 : $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$

其中 n 为某一位点上等位基因数, P_i 为群体中第 i 个位点的基因频率 ; h_i 为第 i 个位点的期望杂合度 ; r 为位点个数, H_e 为群体内平均期望杂合度 ; P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

群体间遗传距离 : $D_s = - \ln I$

遗传相似系数 : $I = J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}$

$J_x = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k X_{ij}^2 / n$ $J_y = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k Y_{ij}^2 / n$

$J_{xy} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k X_{ij} Y_{ij} / n$

其中, I 为两个群体间的相似系数, X_{ij} 、 Y_{ij} 分别为 X 、 Y 群体中第 r 个基因位点上第 k 个基因的频率, n 为检测的基因位点数。

1.2.7 遗传多样性作图 用 PHYLIP V3.6 软件计算遗传距离, 并进行 1 000 次 bootstrap 检验, 再由 MEGA3 (<http://www.megasoftware.net/>) 软件绘制系统树。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

24 个微卫星分子标记, 均能在几个鲤鱼群体中较好地扩增出特异条带, 但是黑龙江鲤群体在 HLJZ05、HLJZ12 和 HLJZ22 三个位点无任何特异条带。部分琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。这些分子标记在 4 个鲤鱼群体中共扩增出 3882 条条带, 每个基因位点的等位基因数从 1~5 不等, 大小为 126~489 bp。在 24 个基因位点上, 共检测出 59 个等位基因, 平均等位基因数为 2.458。

2.2 群体遗传多样性分析

在 4 个群体中检测的有效等位基因数、平均观测杂合度、平均多态信息含量等统计数据见表 3。几种统计参数在 4 个群体间具有一定的差异, 但均

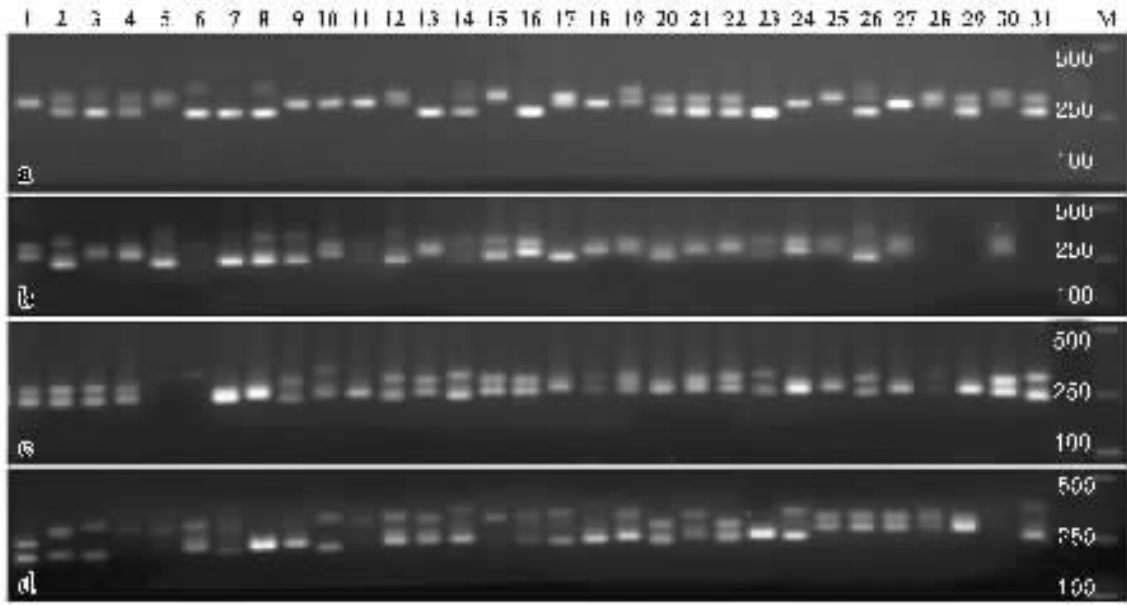


图 1 四个鲤鱼群体在 HLJ046 基因位点的遗传差异

Fig. 1 Genetic diversity in locus HLJ046 of the four carp populations

a : 黑龙江鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*) ; b : 散鳞镜鲤 (*C. carpio*) ; c : 荷包红鲤抗寒品系 (*C. carpio* var. *wuyuanensis*) ; d : 松浦鲤 (*C. carpio* Songpu carp)。

未达到显著水平，群体间遗传多样性差异不明显。

2.3 聚类分析结果

散鳞镜鲤与松浦鲤遗传相似度最高，其次是荷包红鲤抗寒品系与松浦鲤，再次散鳞镜鲤与荷包红鲤抗寒品系；而黑龙江鲤与其他 3 个种群的遗传相

似系数较以上几个种群低（表 4）。而通过 MEGA3 绘制的聚类图（图 2）显示，散鳞镜鲤与松浦鲤首先聚类，其次是荷包红鲤抗寒品系，最后是黑龙江鲤。

表 3 四个鲤鱼群体在 24 个遗传标记基因位点的统计信息
Tab. 3 Some statistic information of 24 genetic markers loci in the four carp populations

	有效等位基因数 Effective numbers of allele (Ne)	平均观测杂合度 Observing value of mean heterozygosity (Ho)	平均期望杂合度 Expected value of mean heterozygosity (He)	平均多态信息含量 Average polymorphism information content (PIC)
黑龙江鲤 <i>Cyprinus carpio haematopterus</i>	55.10	0.364 292	0.515 948	0.240 702
散鳞镜鲤 <i>C. carpio</i>	59.21	0.376 410	0.494 898	0.231 891
荷包红鲤抗寒品系 <i>C. carpio</i> var. <i>wuyuanensis</i>	62.27	0.437 883	0.532 850	0.250 779
松浦鲤 <i>C. carpio</i> Songpu carp	61.95	0.390 736	0.498 776	0.215 210

表 4 四个鲤鱼群体间遗传距离（左下）与遗传相似系数（右上）
Tab. 4 Genetic distance (lower-left triangle) and the genetic similarity index (upper-right triangle) among four populations of common carp

	黑龙江鲤 <i>Cyprinus carpio</i> <i>haematopterus</i>	散鳞镜鲤 <i>C. carpio</i>	荷包红鲤抗寒品系 <i>C. carpio</i> var. <i>wuyuanensis</i>	松浦鲤 <i>C. carpio</i> Songpu carp
黑龙江鲤 <i>Cyprinus carpio haematopterus</i>	***	0.853	0.875	0.844
散鳞镜鲤 <i>C. carpio</i>	0.159	***	0.930	0.965
荷包红鲤抗寒品系 <i>C. carpio</i> var. <i>wuyuanensis</i>	0.134	0.072	***	0.935
松浦鲤 <i>C. carpio</i> Songpu carp	0.170	0.035	0.067	***

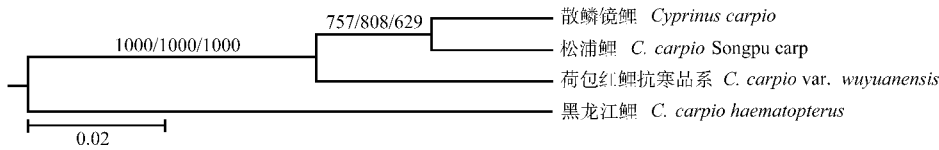


图 2 基于 Ds 的 4 个鲤鱼群体的 UPGMA 聚类分析图
Fig. 2 Cluster analysis of the four carp populations based on Ds using UPGMA method
各分支上的数值分别为最大似然法、邻接法和类平均法经 1 000 次 bootstrap 后的自引导值。
Numbers above the branches are the evolutionary distance based on 1 000 times bootstrapping using the Maximum Likelihood, the Neighbor-Joining and the UPGMA method, respectively.

3 讨论

3.1 所检测数据的有效性分析

有效等位基因数是反映群体遗传变异大小的一个指标，其数值越接近所检测到的等位基因的绝对数，表明等位基因在群体中分布越均匀（Hines et al, 1981）。黑龙江鲤实际被检测到 55 个等位基因，统计有效等位基因数为 55.10；散鳞镜鲤分别为 59、59.21，两者很接近，说明所检测的 24 个基因位点的等位基因在这两个群体基因组中分布很均

匀，结果能较好的反映群体基因组的实际情况。而在荷包红鲤抗寒品系中，这两个值分别是 59、62.27；松浦鲤分别是 59、61.95，略有偏差，说明所检测的基因位点的等位基因在这两个群体的基因组中分布还不够均匀，应适当增加样本数或检测的基因位点数。

另外，从斑马鱼功能基因序列库中查找微卫星并设计合成的 12 对引物，它们所在的基因位点在斑马鱼的基因组中分别位于第 1、2、4、5、9、12、13、15、16、20、22、23 号染色体上，这些分子标

记在 4 个鲤鱼群体中大多扩增出具有多态性的特异条带,说明这些基因位点在种间具有较高的保守性,引物也有一定的通用性。而且,这些原来在斑马鱼的基因组中位于不同染色体的基因位点,在鲤鱼中也很有可能位于不同的染色体。若假设成立,检测的基因位点分布就较均匀,所检测数据的有效性就越高,有效等位基因数也就越接近所检测的等位基因数,这与前述结论相符。但这些结构基因位点在鲤鱼染色体上分布与功能还有待进一步研究。

Nei (1978) 指出当样本容量偏小时,须观测 50 个以上的基因位点;而当样本容量达到 50,检测的基因位点又在 25 以上时,抽样样本偏差较小,检测值就越接近真实值。而 Xie et al (1999) 根据 Tajima 的 DNA 序列抽样分布理论,认为在 DNA 水平上估计种群变异时,样本容量 $n \geq 10$ 时,抽样样本的方差便不会太大。Yan & Zhang (2004) 研究认为,样本大小与所观测到的等位基因数等呈正相关,而与期望杂合度无显著相关;30~50 个个体是微卫星 DNA 分析所需的最小样本量。本实验应用了 30~31 个样本分别分析它们在 24 个基因位点的多态信息,总体来说,检测的数据能较充分的体现出这几个群体在养殖状况下的群体遗传多样性情况。

3.2 遗传多样性分析

本文 4 个鲤鱼群体的杂合度和遗传相似性指数均处于中度多态略偏高水平,这说明各个群体在当前的养殖环境下种质资源良好,能较好地生存繁衍,具有一定的群体稳定性。4 群体平均观测杂合度均小于 0.44,平均期望杂合度都在 0.5 左右,基本符合哈代-温伯格定理中的随机交配群体杂合度不超过 0.5 的标准(荷包红鲤平均期望杂合度为 0.533,可能是因为该鲤鱼为杂交种,目前还未达到遗传平衡;野鲤为 0.515 略大于 0.5 的标准,则可能有少量的其他鲤鱼基因混入,或者某些基因型受环境或人为因素胁迫而死亡,再或者是抽样误差引起)。但目前人为因素等已经对很多生物群体的遗传多样性水平产生了影响,因此我们在今后发展鲤鱼养殖业的同时,也应该注重对其原、良种的保护工作。

3.3 群体间亲缘关系比较

Thorp (1982) 通过分析研究认为:不同物种间遗传相似系数 $I = 0.2 \sim 0.8$ (遗传距离 $D_s = 0.2 \sim 0.8$),同科属群体间 $I = 0.1 \sim 0.5$ ($D_s = 0.5 \sim$

0.9),同种群体间 $I = 0.8 \sim 0.97$ ($D_s = 0.03 \sim 0.2$)。而这 4 种鲤鱼之间遗传相似系数 $I = 0.8439 \sim 0.9654$ ($D_s = 0.067 \sim 0.170$),应属于同一科属或同一种群,此结果与分类学的情况一致。Zou et al (2000) 研究指出,德国镜鲤、荷包红鲤、黑龙江鲤和柏氏鲤之间的遗传距离从 0.0938~0.4286,相比而言,本结果更集中且偏小。而 Chang et al (2004) 指出的江西三红与黑龙江鲤的遗传距离在 0.17~0.23 之间,与本结果相一致。从本文结果可以看出,黑龙江鲤、荷包红鲤抗寒品系、散鳞镜鲤和松浦鲤间遗传距离较小,遗传相似性较高,这是不利于原良种培育和保护的。

经 1 000 次 bootstrap 检验,该系统树中节点的自引导值并不高,这可能与外群(黑龙江鲤)的选择有关。但该系统树的自引导值在 629~1 000 之间,已基本能代表这几个群体的系统进化情况。

聚类先后顺序反映了种群间亲缘关系的远近(Xing et al, 2003)。散鳞镜鲤与松浦鲤首先聚类的结果表明,松浦鲤与散鳞镜鲤亲缘关系最近,其次是荷包红鲤抗寒品系,最后是黑龙江鲤,这与其培育过程是有关联的。荷包红鲤抗寒品系、散鳞镜鲤和松浦鲤三者之间的亲缘关系较近,与黑龙江鲤的亲缘关系较远。荷包红鲤抗寒品系与散鳞镜鲤、松浦鲤的遗传距离仅为 0.072、0.067,而与黑龙江鲤的遗传距离为 0.134,与后者的遗传距离明显比前几个大,这说明该品种的培育较成功,已经形成与其“祖先”(黑龙江鲤)完全不同的品种,并稳定遗传下来。但它与散鳞镜鲤遗传相似度,比它与黑龙江鲤更高却是异常的,可能是因为环境变异影响其发生遗传变异,加之生活习性相近,繁殖时间相同,遗传基因在一定程度上可能发生了交流,致使其遗传上更加相似。这一点有待进一步研究证明。

3.4 三个斑马鱼功能基因相关的微卫星位点上黑龙江鲤无扩增产物的原因

微卫星标记在基因位点无相应扩增条带产生的原因主要有两个:一是该微卫星在引物对应的侧翼序列发生了碱基突变,导致 PCR 扩增失败;二是微卫星基因位点缺失,导致 PCR 扩增条带缺失。而黑龙江鲤在 HLJZ05、HLJZ12 和 HLJZ22 基因位点上无相应条带产生的原因有待进一步实验证明。

微卫星大多是非结构基因,真核生物基因组只有 10% 左右的结构基因(Tautz, 1989)。而人工选择是根据适应性和外形选择,也就是主要针对结构

基因的选择；并且常常对某些性状会向同一个方向进行选择，对结构基因变异产生了极大的影响。所以，人工选育品种的功能基因的变异比较大，但非结构基因的微卫星变异小（Li et al, 2000）。荷包红鲤抗寒品系、散鳞镜鲤和松浦鲤 3 种鲤鱼均为人工选育品种（系），它们在 HLJZ05 等基因位点上有相应扩增片段，而黑龙江鲤却没有，可能与这几个位点来自功能基因区域有关。又由于这 3 种鲤鱼在选育史上是相互关联的，可能这几个结构基因都来自同一种亲本。荷包红鲤抗寒品系从荷包红鲤与黑龙江鲤杂交子代选育，松浦鲤由黑龙江鲤、荷包红鲤、散鳞镜鲤和德国镜鲤经杂交、回交等选育，而散鳞镜鲤是从原苏联鳞鲤和镜鲤后代中选育出的。如果条带的缺失由基因位点缺失产生，那么我们可以推测出，这几个结构基因应为荷包红鲤和散鳞镜鲤的基因组所共有，而且是黑龙江鲤基因组中不含有的几段结构基因。这也从分子水平上说明了黑龙江鲤与散鳞镜鲤、荷包红鲤抗寒品系和松浦鲤具有明显的遗传异质性，因此，HLJZ05、HLJZ12 和 HLJZ22 可以作为黑龙江鲤与其他几种鲤鱼种质资源鉴定的遗传标记，用于检查黑龙江种群的纯度，辅助人工育种的品种选择，如在与其它几种鲤鱼混

养情况下，该群体是否有基因混杂（主要是散鳞镜鲤、荷包红鲤抗寒品系和松浦鲤基因混入，分析人工育种对基因遗传漂变的影响情况等）。

3.5 斑马鱼微卫星遗传标记在鲤科鱼类研究中的应用前景

鲤科为鲤形目中最大的科，拥有 275 属 1 600 种。而鲤亚科鱼类除一些疑似种外，目前我国共有 5 属 26 种和亚种，数量巨大，分布范围广泛。而斑马鱼作为模式生物中与鲤科鱼类亲缘关系最近、研究最深入的种类，可用研究成果很多，开展与斑马鱼的比较基因组研究很有必要。比如，本试验中应用的斑马鱼微卫星标记均是与斑马鱼结构基因相关，在功能上大多与生长和分化相关。McQuown et al (2000) 的研究表明 108 个铲鲟微卫星标记能在高首鲟、湖鲟、中吻鲟和中华鲟上扩增，得到多态性条带的比例为 42%、58%、47% 和 45%。本次 20 个斑马鱼微卫星标记能在黑龙江鲤、散鳞镜鲤、荷包红鲤抗寒品系和松浦鲤中应用的比例，依次为 45%、60%、60% 和 60%。因此，开发在鲤鱼上有利用价值的斑马鱼的遗传标记，对促进鲤鱼的分子遗传学研究，作用巨大。

参考文献：

- Aliah RS, Takagi M, Dong S, Teoh CT, Taniguchi N. 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Fisheries Science*, 65 (2): 235 - 239.
- Chang YM, Sun XW, Liang LQ. 2004. Genetic diversity analysis of genomic DNAs of several representative populations of common carp in China [J]. *Journal of Fisheries of China*, 28 (5): 481 - 486. [常玉梅, 孙效文, 梁利群. 2004. 中国鲤几个代表种群基因组 DNA 遗传多样性分析. 水产学报, 28 (5): 481 - 486.]
- Du CB, Sun XW, Lou YD, Shen JB. 2000. The genetic heterozygosity analysis to wild carp and two cultivated strains of common carp using microsatellite technique [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 9 (4): 285 - 289. [杜长斌, 孙孝文, 楼允东, 沈俊宝. 2000. 应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析. 上海水产大学学报, 9 (4): 285 - 289.]
- Gen HY, Mei YH, Orban L, Komen J. 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp [J]. *Aquaculture*, 234: 85 - 98.
- Hines HC, Zikakis JP, Haenlein GF, Kiddy CG, Trowbridge CL. 1981. Linkage relationships among loci of polymorphisms in blood and milk of cattle [J]. *Dairy Sci*, 64 (14): 71 - 76.
- Li XM, Gu ZX, Li K, Peng ZZ, Gong YC. 2000. The genetic diversity of the pig breeds in China by means of four microsatellite loci [J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 31 (3): 261 - 264. [李雪梅, 谷忠新, 李奎, 彭中镇, 龚炎长. 2000. 应用微卫星标记对中国 10 个品种猪遗传变异的研究. 山东农业大学学报 (自然科学版), 31 (3): 261 - 264.]
- Liang LQ, Sun XW. 2003. Mapping cold tolerance strain on genetic linkage map of common carp [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 18 (4): 278 - 281. [梁利群, 孙效文. 2003. 鲤耐寒性状分子标记在遗传连锁图上的定位. 大连水产学院学报, 18 (4): 278 - 281.]
- Lin KD, Luo C. 2003. Preliminary study on applicability of microsatellite primers developed from common carp for genomic analysis of grass carp [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 12 (2): 121 - 127. [林凯东, 罗琛. 2003. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究. 激光生物学报, 12 (2): 121 - 127.]
- Liu JX, Zhou L, Zhao ZS, Gui JF. 2002. Studies on microsatellite markers of four artificially gynogenetic families in ornamental carp [J]. *Zool Res*, 23 (2): 97 - 105. [刘静霞, 周莉, 赵振山, 桂建芳. 2002. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究. 动物学研究, 23 (2): 97 - 105.]
- Liu JX, Zhou L, Wei LH, Gui JF. 2003. Microsatellite marker analysis on artificially gynogenetic pure link of red white ornamental carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 27 (6): 557 - 562. [刘静霞, 周莉, 魏丽华, 桂建芳. 2003. 红白锦鲤人工雌核发育纯系的微卫星标记分析. 水生生物学报, 27 (6): 557 - 562.]
- McQuown EC, Sloss BL, Sheehan RJ. 2000. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon (Acipenseridae): New primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser* [J]. *Trans Am Fish Soc*, 129: 1380 - 1388.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations [J]. *Amer Naturalist*, 106: 283 - 292.

- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, **89**:583–590.
- Sambrook J, Russell DW, Huang PT, Wang JX, Zhu HC, translation. 1999. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition [M]. Beijing: Science Press. [萨姆布鲁克, 拉塞尔著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础译. 2002. 分子克隆实验指南 (第三版). 科学出版社.]
- Sun XW, Jia ZY, Wei DW, Lu CY, Liang LQ. 2005. Comparison between magnetic beads enriched and small inserted fragment library for microsatellite sequences of common carp [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, **12** (2):192–196. [孙效文, 贾智英, 魏东旺, 鲁翠云, 梁利群. 2005. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究. 中国水产科学, **12** (2):192–196.]
- Tautz D. 1989. Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acid Research*, **17**:6463–6471.
- Thorp JP. 1982. The molecular dock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [J]. *Annual Review of Ecology Systematics*, **13** (1):139–168.
- Xie H, Lu RH, Xiang CM, Zhang J, Qiu T. 1999. Studies on the relationship of three kinds of mitten crabs using RAPD technique [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **23** (2):120–126. [谢浩, 陆仁后, 项超美, 张菁, 邱涛. 1999. 利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究. 水生生物学报, **23** (2):120–126.]
- Xing RL, Ding J, Teng LP, Chang YQ, Song LS. 2003. RAPD Analysis of the polymorphism of genomic DNA among three abalones [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, **18** (3):191–196. [邢荣莲, 丁君, 滕利平, 常亚青, 宋林生. 2003. 3 种鲍基因组 DNA 多态性的 RAPD 分析. 大连水产学院学报, **18** (3):191–196.]
- Yan LN, Zhang DX. 2004. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **50** (2):279–290. [闫路娜, 张德兴. 2004. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响. 动物学报, **50** (2):279–290.]
- Zou SM, Lou YD, Sun XW, Shen JB. 2000. Study on phylogeny relationship of grass carp, Boshi carp and 3 populations of common carp by RAPD fingerprints [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, **7** (1):6–11. [邹曙明, 楼允东, 孙效文, 沈俊宝. 2000. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲤和 3 个地理种群鲤的亲缘关系. 中国水产科学, **7** (1):6–11.]

红嘴巨燕鸥云南鸟类种的新记录

A New Record of the Caspian Tern (*Sterna caspia*) in Dianchi Lake of Yunnan, China

杨 岚

(中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223)

在最近整理标本的过程中, 作者发现 1981 年 4 月 13 日采自云南昆明滇池草海的一只红嘴巨燕鸥 (*Sterna caspia*), 为云南鸥科 (Laridae) 鸟类种的新记录。

据约翰·马敬能等 (2000) 记录, 红嘴巨燕鸥 (*Sterna caspia* Pallas, 1770, Caspian Tern) 中文名为红嘴巨鸥。作者考虑该种鸟类隶属于鸥科的燕鸥属 (*Sterna*), 故建议将中文名修订为“红嘴巨燕鸥”。

鉴别特征: 体形较大, 体重 610 g, 体长 470 mm, 嘴峰长 60 mm, 翅长 340 mm, 尾长 160 mm, 跗蹠长 40 mm。

前额、头顶至后枕白色, 布有黑色纵纹, 枕部和眼下的纵纹较为密集而粗著, 眼先和额部的纵纹较纤细而稀疏。背部和两翅表面银灰色, 外侧初级飞羽色暗, 几呈黑褐色。外侧尾羽较中央尾羽为长, 呈凹尾型, 尾羽端部具暗灰褐色端斑。颊和颏、喉、颈侧及其下体余部均为纯白色。嘴红色 (剥制标本蜕变为橙黄色), 脚黑色。

红嘴巨燕鸥分布范围较广, 几乎遍布世界各地。在中国原记录仅分布于辽宁、广东、台湾和海南岛 (Sibley & Monroe, 1990)。据约翰·马敬能等 (2000) 记录: “指名亚种为不常见留鸟及冬候鸟, 繁殖于沿海从渤海至海南及长江上游; 北方迁徙鸟及南方留鸟同在华南、东南、台湾及海南岛越冬”。在云南省境内为首次记录。

参考文献:

- 约翰·马敬能, 何芬奇. 2000. 中国鸟类野外手册 [M]. 长沙: 湖南教育出版社, 173.
- Sibley CG, Monroe BL Jr. 1990. *Distribution and Taxonomy Of Birds of the World* [M]. Yale University Press.