

青鱼微卫星标记的开发与特性分析

王丰^{①②} 张猛^{①②} 沈玉帮^{①②③*} 徐晓雁^{①②③} 王荣泉^④ 李家乐^{①②③}

① 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306; ② 上海海洋大学上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; ③ 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; ④ 苏州市申航生态科技发展股份有限公司农业部大宗淡水鱼类繁育与健康养殖技术重点实验室 苏州 215221

摘要: 青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 是中国最为重要的淡水养殖鱼类。开发青鱼的微卫星标记能为青鱼的遗传多样性分析提供更多工具。本研究使用磁珠富集法, 利用生物素探针 (CA)₁₀ 和 (GACA)₆, 富集得到青鱼基因组微卫星片段, 进一步通过设计微卫星引物检验其在青鱼原种群体中的有效性和多态性水平。结果显示, 所构建文库中 849 个克隆含有微卫星序列, 通过利用 PCR 技术在吴江原种青鱼 36 个个体中进行多态性筛选, 获得了 25 个多态性微卫星位点。其平均等位基因数 (N_a) 和有效等位基因数 (N_e) 分别为 7.08 和 3.526, 平均观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 0.602 和 0.619, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.568。其中, Mp23、Mp27 和 Mp35 这 3 个位点极显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。本研究开发的微卫星标记能为青鱼种质资源的评价和保护等研究提供工具。

关键词: 青鱼; 磁珠富集; 微卫星; 引物开发; 多态性

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2019) 01-57-09

Development and Characterization of Microsatellite Markers in Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*)

WANG Feng^{①②} ZHANG Meng^{①②} SHEN Yu-Bang^{①②③*} XU Xiao-Yan^{①②③}
WANG Rong-Quan^④ LI Jia-Le^{①②③}

① Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ② Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ③ National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ④ Key Laboratory of Conventional Freshwater Fish Breeding and Health Culture Technology Germplasm Resources, Suzhou Shenhong Eco-technology Development Limited Company, Suzhou 215221, China

Abstract: Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*) is an important aquaculture species in China. Developing microsatellite DNA markers from genome of *M. piceus* will provide a tool for its genetic diversity analysis. In this study, two biotin probes (CA)₁₀ and (GACA)₆ were used to construct two microsatellite enrichment

基金项目 现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-45-03);

* 通讯作者, E-mail: ybshen@shou.edu.cn;

第一作者介绍 王丰, 男, 硕士; 研究方向: 种质资源与遗传育种; E-mail: wangfeng_0315@163.com.

收稿日期: 2018-04-25, 修回日期: 2018-10-29 DOI: 10.13859/j.cjz.201901008

libraries of *M. piceus* by magnetic beads enrichment. A series of microsatellite primers was designed and their polymorphisms were tested in a population of *M. piceus*. Softwares GeneMapperv4.0, Cervus3.0 and PopGen32 were used to analyze their genetic diversity information. Microsatellite markers with high polymorphism and rich genetic diversity were screened. Through analysis, 849 sequences containing microsatellite loci were obtained from 993 positive clones. The repeat number of the repeating unit was then counted (Fig. 1). The statistics showed that most numbers of the repeats were between 5 and 21. The repeating units were classified according to the number of nucleotides in each repeating unit. The results showed that the number of dinucleotide microsatellite loci was the most, as high as 1 076. It accounted for 82.45% of the total. There were 217 trinucleotide type microsatellite loci, accounting for 16.63% of the total. In trinucleotide type, only 0.77% of all 39 microsatellite markers were designed and assessed in 36 individuals of black carp from Wujiang population. Results showed that 25 microsatellite loci showed polymorphism (Table 1). The mean number of alleles (N_a) and effective number of alleles (N_e) were 7.08 and 3.526, respectively. The mean value of observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.602 and 0.619, respectively. The mean value of polymorphic information content was 0.568. Mp23, Mp27 and Mp35 were extremely significant deviating from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$) (Table 2). The microsatellite primers developed in this study will provide a tool and theoretical basis for evaluation and protection of germplasm resources, and genetic diversity analysis in *M. piceus*.

Key words: *Mylopharyngodon piceus*; Enrichment by magnetic beads; Microsatellite; Primer development; Polymorphism

青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 也被称为黑鲩、青鲩, 是中国的“四大家鱼”之一, 在中国乃至世界鱼类养殖中都占有非常重要的比重, 在世界鱼类养殖产量中长期处于前列, 也是长江和沿江水域的重要渔业资源。由于人类对长江水域及周边环境的开发以及过度捕捞, 导致渔业资源急剧衰退。Duan 等 (2010) 的研究表明, 我国四大家鱼的资源近年来不断衰退, 其中, 青鱼捕获量在四大家鱼中的比例较低 (帅方敏等 2017), 其种质资源衰退最为严重。

微卫星标记多态性高, 符合孟德尔遗传规律, 为共显性遗传, 是一种高效的遗传分子标记, 被广泛应用于水产动物的亲缘及家系分析 (孙建华等 2017)、群体遗传多样性和遗传结构分析 (Li et al. 2017) 以及遗传育种 (杨万云等 2017) 等工作。

对于青鱼基因组微卫星标记开发的研究, 仅 Zhu 等 (2013) 开发了 28 个微卫星标记, 但没有对微卫星位点的多态性信息含量

(polymorphic information content, PIC) 和香农信息指数 (Shannon's information index, I) 等重要多态性信息进行分析和检测。本研究使用磁珠富集法, 构建青鱼的微卫星文库, 并且筛选出富有多态性的微卫星引物, 以期对青鱼的数量性状基因座 (quantitative trait locus, QTL) 定位、遗传多样性、群体遗传分析、种质资源保护等研究的开展提供更多支持工具。

1 材料与方法

1.1 材料

构建基因组文库所用的青鱼样本采集自苏州市申航生态科技发展股份有限公司国家级四大家鱼良种场, 该良种场的青鱼原种引自浙江省嘉兴市长江四大家鱼原种场, 引物多态性检测所用青鱼群体采自该良种场的 36 尾原种青鱼, 取鳍条组织, 用无水酒精固定, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。实验所用的生物素标记的探针 (CA)₁₀、(GACA)₆、寡核酸接头 (21mer:

5'-CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA-3', 25mer: 5'-TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A-3') 以及设计的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; *Taq* 酶、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞等试剂采购于天根生化科技(北京)有限公司; 磁珠为 Promega 公司制造。

1.2 青鱼微卫星文库的构建

1.2.1 基因组 DNA 的提取 使用海洋生物基因组 DNA 快速提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)进行 DNA 的提取, 用 TE 缓冲液进行溶解, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计(Thermo, 德国)检测纯度和浓度, 之后于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 青鱼基因组 DNA 的酶切和连接 使用限制性内切酶 *Rsa* I (Thermo Fisher, 上海)对基因组 DNA 进行酶切, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。参考 Yue (2009)、Li (2013) 的方法将寡核苷酸链接头 21mer 和 25mer 与酶切后的基因组 DNA 进行连接, 25 °C 温育 4 h, 完成接头的连接。

以连有接头的基因组 DNA 片段作为模板, 接头 21mer 为引物, 进行 PCR 扩增, 获得特定 DNA 扩增产物。扩增体系为 50 μ l: 2 \times *Taq* Mix 25 μ l (10 μ mol/L), 引物 2 μ l (20 mg/L), DNA 3 μ l 和 ddH₂O 20 μ l。扩增程序为 95 °C 预变性 3 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min; 随后 94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 重复 28 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。获得特定 DNA 预扩增产物。

1.2.3 生物素探针杂交和磁珠富集 用生物素标记的微卫星探针与基因组 PCR 文库进行杂交, 探针 (CA)₁₀ 和 (GACA)₆ 的杂交分别进行。杂交体系为 65 μ l: 10 μ mol/L 生物素探针 1 μ l、20 \times SSC 19.5 μ l、上一步所得 DNA 预扩增产物 10 μ l, 加 ddH₂O 至 65 μ l。杂交程序为: 98 °C 变性 5 min, 55 °C 水浴杂交 20 min。同时进行磁珠的平衡, 磁珠的平衡参考李达

(2014) 的方法。

将平衡好的磁珠与杂交液混合, 25 °C 温育 30 min, 温育时在摇床上轻摇, 使探针上的生物素和磁珠上的链霉亲和素充分结合。温育结束后, 在磁力架上小心去除溶液, 用李达(2014)的洗涤方法进行磁珠的洗涤, 将不含微卫星的序列洗去。然后向洗涤好的磁珠中加入 50 μ l ddH₂O, 室温混匀 10 min, 将含有微卫星序列的单链 DNA 洗下。并以此单链 DNA 为模板, 以接头 21mer 为引物进行 PCR 扩增, 扩增程序同第一次 PCR。之后对 PCR 产物重复一次杂交、富集和 PCR 扩增, 获得最终富集扩增产物。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 克隆测序 将上述扩增产物与 pMD19-T 载体(由 Promega 公司提供)进行连接, 然后转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞中, 建立青鱼的微卫星富集文库。克隆和测序工作交由上海迈浦生物科技有限公司完成。

1.3 微卫星引物设计和筛选

去除载体和接头序列后, 对测序结果进行分析, 使用 SSRHunter (Li 2005) 软件进行微卫星序列中重复单元的搜索, 记录位点的重复情况, 使用软件 Primer Premier 5 (Lalitha 2000) 进行引物设计, 并将序列送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

在已采集的青鱼样本中随机选取 3 份 DNA 样本作为模板, 用所设计微卫星引物对其进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 25 μ l (2 \times *Taq* Mix 12.5 μ l、10 μ mol/L 引物 1 μ l、20 mg/L DNA 1.5 μ l 和 ddH₂O 10 μ l), 并调整合适的退火温度以得到清晰和特异性高的条带。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 2 min; 然后 94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 重复 30 次循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。选择能够成功扩增的引物进行荧光引物的设计, 每对引物上游 5' 端标记荧光基团 6-羧基荧光素 (6-carboxy-fluorescein, FAM) 或六氯-6-甲基荧光素 (hexachlorofluorescein, HEX), 并在

36 个吴江青鱼群体中进行群体 PCR 扩增, 扩增产物送上海迈浦生物科技有限公司进行 STR 分型。

分型结果使用软件 GeneMapper v4.0 (Curri Fraser et al. 2010)、Cervus3.0 (Kalinowski et al. 2007) 和 PopGen32 (Yeh 1997) 进行分析, 统计微卫星引物的等位基因数 (number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、香农信息指数 (I)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量 (polymorphic information content, PIC) 以及哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 等多态性信息。

根据相应的评价标准: 当多态信息含量 (PIC) 小于 0.25 时, 此位点为低度多态性位点; 当多态信息含量 (PIC) 介于 0.25 与 0.50 之间, 此位点为中度多态性位点; 当多态信息含量 (PIC) 大于 0.50 时, 此位点为高度多态性位点 (Botstein et al. 1980)。

2 结果与分析

2.1 微卫星克隆测序结果及序列分析

从实验所得青鱼基因组微卫星富集文库中

选取了 993 个阳性克隆进行测序, 获得含有微卫星重复单元的序列 849 条 (85.5%)。使用 SSRHunter 软件进行微卫星的搜索、确认, 共检测到 1 305 个微卫星位点 (重复次数 ≥ 5 次)。重复单元的重复次数大多在 5~21 之间, 其中, 重复 5 次、6 次和 10 次的重复单元数量最多, 共占总数的 47.74%, 重复次数在 23 次以上的部分最少, 只占总数的 0.92% (图 1)。

以重复单元的核苷酸数目为分类依据进行分类统计, 二核苷酸型的微卫星位点共 1 076 个, 占总数量的 82.45%, 其中, 二核苷酸重复单位 AC/GT 重复 957 个 (88.94%), 另外还检测到 104 个 AG/CT 重复 (9.67%) 和 11 个 AT/CG 重复 (1.02%)。四核苷酸型的微卫星位点共 217 个, 占总数量的 16.63%。三核苷酸型的微卫星位点数量最少, 只有 12 个, 占总数量的 0.92%。

2.2 引物设计和检测

在含有微卫星位点的序列中随机选取 80 个位点, 使用 Primer Premier 5 进行引物设计, 在其中选择了退火温度在 45~65 °C 的 66 对进行引物的合成。在青鱼的吴江群体中随机选取 3 份 DNA 样品, 利用合成的微卫星引物对其进行 PCR 扩增, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 有 39 对引物能扩增出预期条带。

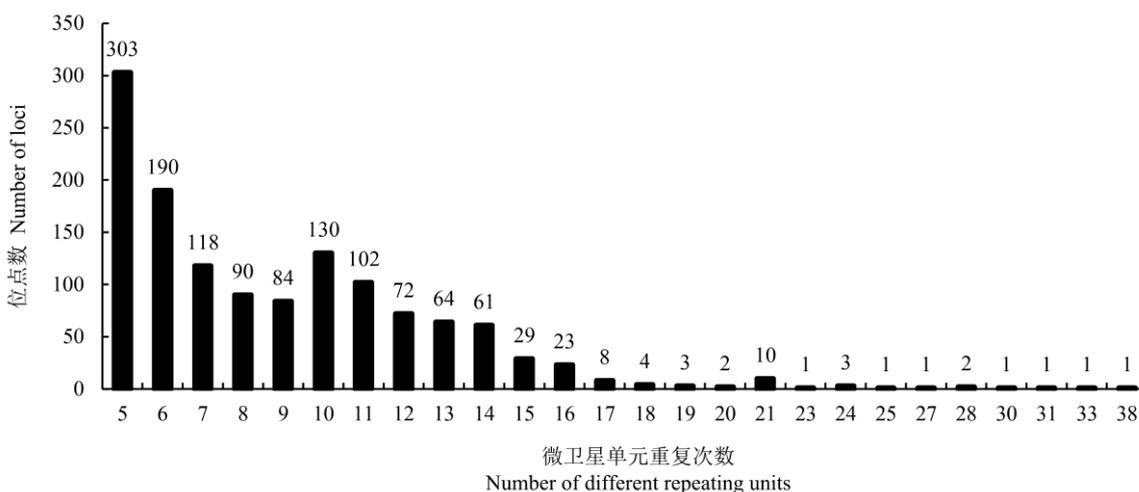


图 1 微卫星重复单元的重复次数分布图

Fig. 1 Number of different repeating units

2.3 引物的多态性检测

将筛选出的 39 对引物设计了荧光引物,并在吴江 36 个青鱼群体中进行群体 PCR 扩增。扩增结果进行 STR 分型,分型结果通过 GeneMapperv4.0、Cervus 和 PopGen32 软件分析,发现在这 39 对微卫星引物中,有 25 对 (64.1%) 显示出较好的多态性 (表 1)。在这 25 个微卫星位点中,每个位点的等位基因数 (N_a) 在 2 ~ 18 之间,平均等位基因数为 7.08;观测杂合度 (H_o) 为 0.278 ~ 1.000,平均为 0.435;期望杂合度 (H_e) 为 0.263 ~ 0.910,平均为 0.602。香农信息指数 (I) 0.428 ~ 2.436,平均值为 1.290;多态信息含量 (PIC) 为 0.225 ~ 0.889,平均值为 0.563。其中,14 个位点表现出高度多态性,10 个位点表现出中度多态性,1 个位点 (Mp01) 为低度多态性 (表 2)。在 25 个位点中,有 22 个符合 Hardy-Weinberg 平衡,3 个位点 (MP23、Mp27、Mp35) 极显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。

3 讨论

由于磁珠富集法需要经过酶切、连接、探针杂交、磁珠富集等过程,实验步骤较为繁琐,因此近年来利用高通量测序等技术 (Sahu et al. 2014) 开发微卫星的研究日益增多。但是磁珠富集法依旧因其技术成熟、成本低、效率高、微卫星位点数量大 (刘红艳等 2017) 等优势特点而被广泛运用,在水产动物中的应用也已经发展得比较成熟,在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) (马海涛等 2007)、鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) (谭照君等 2011)、鳙鱼 (*Aristichthys nobilis*) (Cheng et al. 2008)、柔鱼 (*Ommastrephes bartramii*) (刘连为等 2014) 等多种鱼类中开发出了大量的微卫星位点。本研究所用探针类型为 (CA)₁₀ 和 (GACA)₆,但在所得含有微卫星的片段中还检测到 104 个 AG/CT 重复 (9.67%) 和 11 个 AT/CG 重复 (1.02%)。在微卫星开发过程中得到与所用探针碱基类型不同的微卫星位点的情

况在草鱼 (孙效文等 2005) 和长臀鲢 (*Cranoglanis boudierius*) (孔杰等 2016) 等鱼类的微卫星开发中也出现过。推测可能是部分片段中含有不止一种类型的微卫星重复单元,因此在富集过程中随着片段一起被收集,测序后在检测过程中被识别。

本研究通过磁珠富集法成功构建了青鱼基因组微卫星富集文库,并且从 993 个阳性克隆中筛选出了 849 条含有微卫星的序列,效率达到了 85.5%。与其他鱼类相比,草鱼 (孙效文等 2005) 效率为 86.36%,本研究与之相当;诸氏鲮虾虎鱼 (*Mugilogobius chulae*) (蔡磊等 2015)、宽口光唇鱼 (*Acrossocheilus monticolus*) (刘瑞成等 2013) 和鲮 (*Cirrhinus molitorella*) (刘佳瑶 2012) 分别为 77.89% 和 71.4% 和 62.5%,本研究效率均高于这些研究。

本研究所得到的微卫星位点中,二核苷酸型和四核苷酸型的微卫星位点数量均远大于三核苷酸型,这与建立微卫星富集文库时所用的两碱基和四碱基探针类型有关。但二核苷酸型位点数量又远大于四核苷酸型,因此在微卫星位点中,二核苷酸型位点成为主要存在类型,占据总位点数的八成之多。类似情况在其他使用生物素探针开发微卫星的研究中也多是如此 (朱传坤等 2017)。由此可初步推论,大部分微卫星位点以二核苷酸重复类型存在,因此在借助生物素探针进行微卫星开发时,使用二碱基探针会比三碱基、四碱基探针具有更高的效率。根据微卫星位点产生突变的原理,重复单元重复次数越多,产生的等位基因越多 (裴宋雨等 2015),本实验扩增结果和该理论基本吻合,并且重复次数较多的位点多态性也相对较高,因此设计微卫星引物时可优先选择重复次数较多的位点,以提高多态性引物的开发效率。

有研究表明在濒危物种的种群遗传学研究中,经常会遇到不符合哈迪-温伯格平衡的现象,原因主要有亚种群结构、近亲交配和无效等位基因等导致的杂合度不足 (郑基阳等 2011)。本研究所开发的 25 个多态性微卫星位

表 1 青鱼 25 个微卫星位点及引物信息表

Table 1 Information of 25 microsatellite loci and primers in *Mylopharyngodon piceus*

位点 Locus	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	重复单元 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature T _m (°C)	预期长度 Expected size (bp)
Mp01	F: AAGCACCAGCCACAACAA R: CGAATGAGACGAGTGAGAGA	(CA) ₈	52.7	192
Mp06	F: CGTTTGTGATGTGCTCG R: GCTGATGTCCGTCTTCTGG	(GT) ₁₂	51.4	391
Mp13	F: CCACCTGCGTCAGTAAAAAG R: AAGTCACACCATGGGGAAT	(GT) ₇	51.8	233
Mp14	F: GCGAGTGAACAGAGAGAGA R: CCAGACCTGGATTAAAAACA	(TG) ₇	52.7	206
Mp17	F: GTTGTGTGGGTATTGTTGT R: CTGGCATGTGTAATGTAG	(TG) ₈	50.0	271
Mp20	F: GAATCTCTAACAGGCATCCA R: CACTGCACTGCTCTCAACTT	(GT) ₁₀	50.2	276
Mp21	F: GAAAGGCAAACACAGAGGT R: GAGAGAGAGCAGCAAGAC	(TG) ₁₆	51.0	287
Mp23	F: GGGATTGAGTTGATGCTGT R: CCTGAGTTTGTAAGTCTTTCTG	(GT) ₅	50.5	343
Mp27	F: CTCGTGTGAACCTGCTGGC R: ATGCTTTTGCTCTTGCGA	(AC) ₆	54.0	346
Mp30	F: TGAGTTATGTTGGAATATGAGG R: GCGTAGATTAAGTGACTAAGAGTA	(TCTA) ₉	49.5	373
Mp34	F: GAAATGCTACATGCAGCTTAT R: TCCTGAGATCCTGGACTATG	(AC) ₁₁	50.7	225
Mp35	F: TCCACAAGGGAAATAATCAT R: ACGAGAGACAAAGAGCAACA	(TG) ₁₂	47.3	391
Mp36	F: TAACCTACCGTCACTTTTGC R: TCCTTCCTTCCTCTCTTTTC	(ATCT) ₁₀	49.6	280
Mp40	F: CTTTCACTCGCTCTCTCTGG R: TCTCCCTTTTGTCTTCTGT	(TG) ₁₀	53.5	456
Mp43	F: GACTAACACGTTGTAGACCTGA R: TCCTTCTCTCTCTTTTCGA	(AC) ₉	52.1	390
Mp44	F: CTCTGTCTGTCTGAACCGAACC R: CAATCTCTGCAAGCTAACCCT	(GA) ₂₁	56.8	231
Mp46	F: TACGTGATAAACAATCGACCAT R: GGGAGAGCAGAGGTGTAGAGAC	(CT) ₁₈	55.2	239
Mp49	F: ATACAGCACGCCAAATACGAA R: GAACCCTGAGATGCAACCAAC	(CT) ₂₀	58.7	328
Mp54	F: GCAGAGTCGGAAATGAGAGC R: CTGAGAAAATGCAGAAAAGCG	(CA) ₁₈	56.3	197
Mp56	F: GGATGGACAGACAAACAAGC R: CAGAAAATCAAACCGAAGGA	(GATA) ₅ ... (AGAC) ₅	55.4	335
Mp61	F: AGGTGAGACCATGAGCCAAC R: CCAAAAACACAAGCATAACAGA	(TC) ₅ ... (CT) ₇ ... (CA) ₁₃	56.4	292
Mp62	F: GACATAGAGAGAATGACAGACCG R: ATAAACCAGAGAGCCAAAAAGG	(GACA) ₅	55.8	452
Mp63	F: TGTTCCCTTTTTCACCCTT R: ATCTCCCTCTCTCCTCACC	(CA) ₁₅	56.5	354
Mp65	F: GGTAACCTACCGTCACTTTTGC R: ACACTTTTCTCCTTCCTCTC	(ATCT) ₈	56.4	281
Mp66	F: ATCCCGAGCCAGAGAGAAG R: CAAAAGCGAAGACGGCCAAT	(AGAC) ₅ ... (AGAT) ₆	60.6	392

表 2 青鱼基因组中 25 个微卫星位点的遗传多样性信息

Table 2 Polymorphic information of 25 microsatellite loci in *Mylopharyngodon piceus*

位点 Locus	等位 基因数 Number of alleles N_a	有效等位 基因数 Effective number of alleles N_e	香农信息 指数 Shannon's information index I	观测杂合度 Observed heterozygosity H_o	期望杂合度 Expected heterozygosity H_e	哈迪-伯格温平衡 Hardy-Weinberg equilibrium	多态信息含量 Polymorphic information content
Mp01	2	1.349	0.428	0.306	0.263	0.178	0.225
Mp06	4	1.845	0.846	0.389	0.464	0.426	0.417
Mp13	3	1.727	0.660	0.306	0.427	0.264	0.343
Mp14	2	1.456	0.493	0.278	0.318	0.457	0.264
Mp17	4	1.760	0.782	0.556	0.438	0.276	0.383
Mp20	7	2.629	1.287	0.500	0.628	0.172	0.582
Mp21	10	2.248	1.248	0.417	0.563	0.989	0.525
Mp23	2	2.000	0.693	1.000	0.507	0.000**	0.375
Mp27	4	2.664	1.114	0.389	0.633	0.002**	0.553
Mp30	7	1.844	1.006	0.417	0.464	0.359	0.436
Mp34	15	6.629	2.273	0.500	0.861	0.309	0.837
Mp35	2	1.670	0.591	0.556	0.407	0.006**	0.321
Mp36	6	3.484	1.416	0.639	0.723	0.540	0.669
Mp40	9	2.796	1.353	0.500	0.651	0.953	0.587
Mp43	3	1.919	0.721	0.528	0.485	0.755	0.377
Mp44	15	9.781	2.422	0.972	0.910	0.771	0.889
Mp46	6	2.290	0.987	0.361	0.571	0.641	0.469
Mp49	9	4.313	1.692	0.889	0.779	0.241	0.736
Mp54	16	8.583	2.379	0.917	0.896	0.969	0.873
Mp56	18	8.416	2.436	1.000	0.894	0.994	0.871
Mp61	4	2.266	0.983	0.528	0.567	0.060	0.488
Mp62	8	4.571	1.720	0.750	0.792	0.609	0.752
Mp63	5	3.293	1.365	0.889	0.706	0.183	0.652
Mp65	6	3.484	1.416	0.639	0.723	0.540	0.669
Mp66	10	5.133	1.933	0.833	0.817	0.219	0.785
平均 Mean	7.08	3.526	1.290	0.602	0.619	0.437	0.563

。极显著偏离 ($P < 0.01$)。, Extremely significant deviations ($P < 0.01$)。

点中, 有 3 个位点 (MP23、Mp27、Mp35) 极显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。经分析, 这 3 个位点的观测杂合度和期望杂合度与其他位点相近, 李达 (2014) 在草鱼中开发的微卫星位点中也有部分位点偏离哈迪-温伯格平衡, 且杂合度与其开发的其他位点相近, 该结果与

本研究类似。因此推测造成这 3 个位点偏离哈迪-温伯格平衡的原因有以下几点: 由于环境恶化、人类活动等原因导致种群数量减少, 致使种群内杂合度不足; 可能这 3 个位点存在无效等位基因或者杂合子丢失的情况; 由于所采集的青鱼群体数量过少, 所取得的数据与种群总

体的真实情况存在一定的偏差,从而导致这 3 个位点偏离哈迪-温伯格平衡。

参 考 文 献

- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human*, 32: 314–331.
- Cheng L, Liu L, Yu X, et al. 2008. Sixteen polymorphic microsatellites in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and cross-amplification in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Molecular Ecology Resources*, 8(3): 656–658.
- Curriehraser E, Shah P, True S. 2010. Data analysis using GeneMapper® v4.1: Comparing the Newest Generation of GeneMapper Software to Legacy Genescan® and Genotyper® Software. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21(Suppl 3): S31.
- Duan X B, Liu S P, Huang M G, et al. 2010. Changes in abundance of larvae of the four domestic Chinese carps in the middle reach of the Yangtze River, China, before and after closing of the Three Gorges Dam. *Environmental Biology of Fishes*, 86(1): 13–22.
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099–1106.
- Lalitha, S. 2000. Primer Premier 5. *Biotech Software & Internet Report*, 1(6): 270–272.
- Li D, Shen Y B, Fu J J, et al. 2013. Isolation and characterization of 25 novel polymorphic microsatellite markers from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Conservation Genetics Resources*, 5(3): 745–748.
- Li L, Lin H, Tang W, et al. 2017. Population genetic structure in wild and aquaculture populations of *Hemibarbus maculatus* inferred from microsatellites markers. *Aquaculture and Fisheries*, 2: 78–83.
- Li Q, Wan J M. 2005. SSRHunter: development of a local searching software for SSR sites. *Hereditas*, 27(5): 808–810.
- Sahu B P, Sahoo L, Joshi C G, et al. 2014. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Indian major carp, *Catla catla* using next-generation sequencing platform. *Biochemical Systematics & Ecology*, 57(3): 357–362.
- Yeh F C. 1997. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129: 157.
- Yue G H, Zhu Z Y, Wang C M, et al. 2009. A simple and efficient method for isolating polymorphic microsatellites from cDNA. *Bmc Genomics*, 10 (1): 125.
- Zhu X, Zhang F, Cao W. 2013. Isolation and characterization of 28 polymorphic microsatellite loci in black carp (*Mylopharyngodon piceus*). *Conservation Genetics Resources*, 5(2): 469–472.
- 蔡磊, 陈小曲, 郑伟强, 等. 2015. 诸氏鳊鱼多态性微卫星标记的开发及评价. *中国实验动物学报*, 23(1): 57–62.
- 孔杰, 蒋晓红, 周洲, 等. 2016. 磁珠富集法开发长臀鲮微卫星分子标记. *贵州农业科学*, 44(7): 14–17.
- 李达. 2014. 草鱼微卫星标记开发及 9 个养殖群体遗传多样性分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 刘红艳, 熊飞, 宋丽香. 2017. 长江上游特有鱼类红唇薄鳊微卫星 DNA 分离及序列特征分析. *江西农业大学学报*, 39(1): 145–152.
- 刘佳瑶. 2012. 鳊微卫星分子标记的筛选及遗传多样性分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 刘连为, 陈新军, 许强华, 等. 2014. 北太平洋柔鱼微卫星标记的筛选及遗传多样性. *生态学报*, 34(23): 6847–6854.
- 刘瑞成, 张富铁, 但胜国, 等. 2013. 宽口光唇鱼微卫星位点的筛选与特征分析. *四川动物*, 32(2): 161–166.
- 马海涛, 鲁翠云, 于冬梅, 等. 2007. 草鱼基因组中微卫星分子标记的制备及筛选. *上海海洋大学学报*, 16(4): 389–393.
- 裴宋雨, 任志勇, 焦振彬, 等. 2015. 香椿 (*Toona sinensis*) 微卫星富集文库构建及特性分析. *种子*, 34(2): 13–16.
- 帅方敏, 李新辉, 黄艳飞, 等. 2017. 珠江水系四大家鱼资源现状及空间分布特征研究. *水生生物学报*, 41(6): 1336–1344.
- 孙建华, 马爱军, 崔文晓, 等. 2017. 利用微卫星标记技术对红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 家系系谱认证的研究. *海洋科学进展*, 35(3): 392–403.
- 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 2005. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记. *水产学报*, 29(4): 482–486.
- 谭照君, 张天奇, 鲁翠云, 等. 2011. 鲢三、四核苷酸重复微卫星标记的筛选及其特征分析. *上海海洋大学学报*, 20(3): 328–335.
- 杨万云, 郑军军, 贾博寅, 等. 2017. 微卫星分子标记及其在动物

- 遗传育种中的研究进展. 基因组学与应用生物学, 2017(11): 4644-4649.
- 郑基阳, 陈乃富, 王晖, 等. 2011. 霍山石斛微卫星标记的筛选及遗传多样性分析. 中国中药杂志, 36(21): 2926-2931.
- 朱传坤, 潘正军, 王辉, 等. 2017. 乌苏里拟鲮微卫星文库的构建及分析. 水生生物学报, 41(2): 473-478.