

牙鲆渤海自然群体的遗传多样性分析

刘永新^{1*}, 朱以美², 刘英杰¹, 高磊¹, 方辉¹,
韩刚¹, 王玉芬³, 姜秀凤³, 刘海金^{2*}

(1. 中国水产科学研究院, 北京 100141;
2. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;
3. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100)

摘要:为分析牙鲆自然群体的遗传多样性并筛选出能有效鉴定群体遗传特征的特异性微卫星标记, 实验收集了渤海流域 74 尾野生个体组成实验群体。选择牙鲆 24 个连锁群上不同区域的 72 个微卫星标记进行遗传分析, 其中, 近着丝粒区域包含 17 个标记, 连锁群中部包含 19 个标记, 远着丝粒区域包含 36 个标记。结果显示: 在连锁群不同区域上等位基因数 (A) 介于 6.400 ~ 7.389, 有效等位基因数 (N_e) 介于 4.469 ~ 5.129, Shannon 多样性指数 (I) 介于 1.565 ~ 1.683; 观测杂合度 (H_o)、无偏倚杂合度期望值 (H_e) 和多态信息含量 (PIC) 的范围分别为 0.568 ~ 0.593, 0.738 ~ 0.753 和 0.707 ~ 0.746; Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (d) 在 -0.200 以下; 群体内个体之间的遗传距离在 0.620 以上。各项遗传参数表明该实验群体具有较为丰富的遗传多样性, 个体之间具有相对较远的遗传距离, 适宜作为基础群体进行选育。位于连锁群不同区域的微卫星标记获得的遗传参数并无明显差异, 验证了标记所在位置与标记多样性高低不存在必然联系, 但这些多态性标记可以作为分析牙鲆群体遗传结构的候选标记。

关键词: 牙鲆; 自然群体; 微卫星; 着丝粒

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

水产动物选择育种研究首先需要收集具有丰富遗传多样性的自然群体或来自不同国家的地理种群, 之后, 针对如生长、抗病、品质等目标性状进行遗传改良研究。因此, 准确进行群体的遗传结构分析, 判断群体是否拥有足够的遗传变异, 是决定整个育种计划成败的关键所在。目前, 分析水产动物群体遗传多样性的方法首选微卫星 DNA 分子标记, 利用其检测的主要品种包括: 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[1]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[2]、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[3]、黄颡鱼 (*Pseudobagrus fulvidraco*)^[4]、吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[5]、白甲鱼 (*Onychostoma sima*)^[6]、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)^[7]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[8]、马氏珠母

贝 (*Pinctada martensii*)^[9]、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[10] 等等。这些研究的遗传多样性鉴定结果为下一步开展新品种选择育种奠定了坚实的基础。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是分布于我国东南沿海的大型经济鱼类, 以生长快、适应性强、味道鲜美而闻名, 深受东亚各国消费者的喜爱^[11]。早在 20 世纪 70 年代, 牙鲆就已经被开发为主要人工养殖对象。近些年来, 随着牙鲆野生资源的严重枯竭和累代繁殖, 养殖苗种逐渐暴露出生长速度降低, 抗逆性弱, 耐高温性差, 不适应高密度集约化养殖等缺点。为了提高养殖产量和经济效益, 选育适合人工养殖的优良品种是养殖业界的一致呼声。牙鲆“鲆优 1 号”和“北鲆 1 号”新品种的诞生, 在一定程度上缓解了生产中

收稿日期: 2013-07-19 修回日期: 2013-09-06

资助项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD26B01); 国家鲆鲽类产业技术体系专项 (CARS-50-G2)

通信作者: 刘永新, E-mail: liuyx@cafs.ac.cn; 刘海金, E-mail: liuhaijin1951@126.com

对于良种的迫切需求,这2个品种的培育起点皆为来自不同地理区域的种群^[12-14],但对这些群体的遗传多样性分析结果,则鲜有介绍。至今,利用微卫星标记进行牙鲆遗传结构分析的群体主要分为3类:自然群体^[15-16]、养殖群体^[17-19]和繁育后代群体^[20]。在这些研究中,所采用的微卫星标记为完全随机选取,并未覆盖全部连锁群。有鉴于此,本研究以牙鲆渤海自然群体为研究对象,结合已经完成的标记-着丝粒作图结果^[21-22],选择近着丝粒、连锁群中部、远着丝粒3个区域的微卫星标记分析群体遗传多样性,旨在检测该群体是否具有足够丰富的遗传度,能否作为选择育种的基础群体。同时,筛选出有效鉴定群体遗传特征的多态性标记,为今后的牙鲆优良家系选育研究工作提供基础理论数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用牙鲆选自中国水产科学研究院北戴河中心实验站选育基础群体,该群体由2009年至2012年在渤海流域捕获的野生个体组成,个体体质量范围为1.72~4.86 kg,体长范围为38.55~71.38 cm。野生个体的确认原则为鱼体腹面全部为白色,无任何深色斑点或斑纹。挑选74尾发育

达性成熟的个体作为材料,采集其腹面胸鳍样品用于DNA提取。

1.2 基因组DNA的提取

将裂解液(50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 200 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1% SDS, 200 μg/mL Proteinase K)加入剪碎的鳍条中,50 °C消化至澄清,加入等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提1遍,2.5倍体积预冷的异丙醇沉淀,0.1 mL 70%乙醇清洗沉淀,60~80 μL 1×TE溶解,稀释至合适浓度,-20 °C保存待用。提取完成后,采用琼脂糖凝胶电泳检测DNA样品的质量,紫外分光光度计测定OD₂₆₀值,确定DNA的浓度。

1.3 微卫星标记

从已经完成的标记-着丝粒图谱^[21-22]上选择72个高多态性的微卫星标记,标记名称、引物序列和GenBank登录号列于表1中。每个标记所在的连锁群(linkage group, LG),标记-着丝粒(marker-centromere, M-C)之间的遗传距离及其所在区域列于表2中。其中,近着丝粒区域的标记有17个,M-C的遗传距离为0~15 cM;连锁群中部的标记有19个,M-C的遗传距离为15~33.5 cM;远着丝粒区域的标记有36个,M-C的遗传距离为33.5~50 cM。

表1 72个微卫星标记的名称、引物序列和GenBank登录号

Tab. 1 Loci, primer sequences and accession numbers in GenBank of 72 microsatellite markers

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	登录号 GenBank accession no.	位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	登录号 GenBank accession no.
<i>Poli784TUF</i>	F: TGAGGTTGTCTCCCTTCCTG R: CAGAGCAGTGTCACCAGA	EF112749	<i>Poli1446TUF</i>	F: TATGGCCTACACAGCAGCAG R: CGTGAACCTGTGCGAAACTG	DQ889011
<i>Poli1181TUF</i>	F: GGGTGAACAGATGTCGTTT R: TCAAAATGGCTTTTGTGCTG	EF112955	<i>Poli1797TUF</i>	F: CGAGGCCAGTTTGGTTGTAT R: GAAGGCCTTGGTTTTACAT	AB459084
<i>Poli1076TUF</i>	F: GGTTTAACGGTAGAGTTTGCACAGC R: GGAAGCCACTACCATACCAATACCA	AB458945	<i>Poli966TUF</i>	F: GCCTGGAGGAGAAAACAACA R: AACCTCCAAGGCACAACAAC	EF112892
<i>Poli824TUF</i>	F: TGTGATGGAGAGAGGCTGTG R: TCTCCAACAGCAGACAGTGG	EF112781	<i>Poli818TUF</i>	F: TCAGCTTCACGCTCCACAC R: GCAGAGAGGGAATCCACAAC	EF112777
<i>Poli866TUF</i>	F: TGTGTGCTCTTGCATGCTCT R: GAGCGATAGGGACTGTCAGG	EF112814	<i>Poli1260TUF</i>	F: GCATTGTGCTGTTTCATGTG R: AAGAGCCAGGCTGCATTTTA	EF113016
<i>Poli1077TUF</i>	F: CCTGCTCACTCACTGTTCTACTCT R: ACAGGAGTGAATGATGGAGACGAC	AB458946	<i>Poli1819TUF</i>	F: GGAGAATGCGAGTTCTGTCTTT R: AACTGCAATAATGCACCTCCTT	AB459105
<i>Poli1431TUF</i>	F: CACTCGAGAGCTTTGACAACA R: CATGTTGGTCGCATTGTAGC	DQ888996	<i>Poli637TUF</i>	F: CAGGGCGTCAACTTTTCTTT R: TACACCACCGTTCTCCTTC	EF112597
<i>Poli1106TUF</i>	F: GTAGAAACACGCCCAAGGTG R: TGTGCACACACATGTTCA	AB458951	<i>Poli9-8TUF</i>	F: GAGAGACAGAAGGTCGTCACCGTA R: ACAAAAGACCACGATGCAAAGTGAC	AB037989
<i>Poli1831TUF</i>	F: TCACCTCACAGTGTTCATAAACC R: ACACAAGACGAGGACCTCTACC	AB459116	<i>Poi13</i>	F: ATCCCGTAACAGCCAATCAG R: CGTCCAGGACAATCAGGACT	AB046746

续表 1

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	登录号 GenBank accession no.	位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	登录号 GenBank accession no.
<i>Poli1393TUF</i>	F: AGTCAGAGGCAGGTGCTGAT R: ACACCACAGTGCGTGACATT	DQ888958	<i>Poli1755TUF</i>	F: CTGCTTGCTCATTCTTGCTG R: GGGATTCAACACACACAGA	AB459046
<i>Poli1359TUF</i>	F: GCCCAGTAAGTAGGTACGAGA R: CCTCCGGGATGAATAAAGT	DQ888932	<i>Poli1659TUF</i>	F: CAGCAGCGAGGAAGTTTATCAAGA R: AGACATTTGTGTGAATGAGCCCT	AB458989
<i>Poli148TUF</i>	F: GGCTGCTGACGTAGATGACA R: CGGAGTACCGGTCAGAGAAC	AB459422	<i>Po25A</i>	F: AGTCAGGTTTCAGGCCACTG R: CAGAAGTGTGTCGCAGGAA	AB046749
<i>Poli151TUF</i>	F: GATCAGTGCTGTAAAGGTAGCTGG R: GGAGACGTTAGTTGTGAGGAAAC	AB459425	<i>Poli1407TUF</i>	F: TGTGTTGGTGGAGCTTCTG R: GCAGAGAGGGAGCTGAGAGA	DQ888972
<i>Poli1120TUF</i>	F: CTGAAACTCTGCGTGCAGTC R: CGGGCTATCATCAGGCTAAC	EF112916	<i>Poli127TUF</i>	F: TCCTCAACCAACACACTGATGTTA R: CACTCCCTGG TTTCTGTTCATG	AB459404
<i>Poli9TUF</i>	F: GATCTGCAGAAACACACTCA R: GCGAGTTCTTCTCAAATGC	AB037980	<i>Poli1915TUF</i>	F: CACTCGAAGCTCCTAACAGTGA R: CCTTTGCTGAGCTGAACTG	AB459185
<i>Poli1513TUF</i>	F: TGCAGCCATCTTCTCTCTT R: ACCCGCCAGTAGACAACAA	DQ889072	<i>Poli1966TUF</i>	F: CGTCAGAAATCCATCATCATC R: AAGCTGAGGGTGGGAACAC	AB459226
<i>Poli134TUF</i>	F: AGAGGGATGTGTCCAAGAGG R: GTTTTCGGCCTTAATGAGCA	AB459410	<i>Poli1864TUF</i>	F: GGCTAAATCCTGTAACTCAGC R: ATCAAGAGCAACATGACTGTGG	AB459140
<i>Poli107TUF</i>	F: TGGAAAGAGATGTGCACTTGACTGTC R: AACTGTCACCTCTGAGTGGACCG	AB037990	<i>Poli1010TUF</i>	F: TAACTCCGGTCTGTGAAGC R: CAGTCCGATCCAACACAATG	AB458907
<i>Poli1009TUF</i>	F: TTTGGCATGCAAGTGTGTCT R: GCGCCTGTGATTAGAGTGATT	AB458906	<i>Poli975TUF</i>	F: CTGCAGATGTTTGCACATGA R: GGACAAGATCCTGCACGTTT	EF112900
<i>Poli1801TUF</i>	F: CCTGCAGAGAAACAGTACGATG R: AAGGTGACAGAAAGGAGCACT	AB459088	<i>Poli55MHFS</i>	F: GGATGACAAGGACGCTGACT R: GTGTTTCAGCCGCTTACAT	AB459293
<i>Poli159TUF</i>	F: CACAAGGAAGTCCCCATGTT R: GGTGTGTGTGGGAGTGACAG	AB459431	<i>Poli1490TUF</i>	F: CAACACTGCGTCACCATCTT R: AGTGTCCCACACCTCTCAGC	DQ889052
<i>Poli1450TUF</i>	F: CCACAAATCAGAGTTTCAGCAG R: CTGCGGATGAAGACAAGAAAC	DQ889015	<i>Poli1773TUF</i>	F: TGGAGACCAAGACCCCAATA R: GTTCAGAGGGAGGGAGTGGT	AB459063
<i>Poli1118TUF</i>	F: GTCCTCACGCAAGCTCATCT R: GAAGCCAGGAGACACTGAGG	EF112915	<i>Poli1779TUF</i>	F: GGGGTTTCAGCAAATACAGGT R: TGCAGCTCTTTCATTCCACA	AB459069
<i>Poli1825TUF</i>	F: ACAAGCGGTGCACATTTAAC R: TTCAAACAGGAGCTGCATTG	AB459110	<i>Poli1838TUF</i>	F: CTCCTTCAGTTAACCCCAAGTG R: TGACACAGCATTACCTGAGACC	AB459120
<i>Poli1813TUF</i>	F: CGGCGGTTTCCATTATAAGTC R: AAGGTCGACACCGCAGTAAC	AB459099	<i>Poli1852TUF</i>	F: CACCCTCACATCTTGGTTTTCT R: TGAACCTTGTGTTGATGTTGCAG	AB459132
<i>Poli1392TUF</i>	F: TCAGTGGATCGAGAACAGGA R: TATTACGCACAGAGGCCACA	DQ888957	<i>Poli1827TUF</i>	F: CAAGGCTGCTGTCATGATGT R: CCTCCACCTCTTCTGAGTGC	AB459112
<i>Poli1936TUF</i>	F: CAGAAATCGTTATGCACCCATT R: GCTGCTAAATCCCACTTGACAG	AB459201	<i>Poli1925TUF</i>	F: GTAAAACAATGTTGCAGCCAGA R: TCCTCCATCAGTGTGAGTAAGG	AB459193
<i>Poli753TUF</i>	F: TTGCTCCTGTTTCTCTGTTT R: GATGTGATGCAGTCCCACAC	EF112734	<i>Poli1451TF</i>	F: GATGCTGTTGCTGATGCTGT R: TACCTGGCAAGCCTTAGTG	DQ889016
<i>Poli1412TUF</i>	F: ACATGTAATCCCGCTCTGC R: CGGTTTCGTGATGGGATTAGT	DQ888977	<i>Poli1579TUF</i>	F: TTTTCACTGGTGGAGGAACC R: TTGCAACACTGCTTCTCACTG	AB458967
<i>Po15</i>	F: GTTTGTTTGGCTGCACAATG R: GCACCCTCTCAGCTTGTCT	AB057727	<i>Poli1498TUF</i>	F: TTCCTCTGATGCTTCTTGTT R: TTCGGCAAAAACCTGACACT	DQ889058
<i>Poli1642TUF</i>	F: CTGTCTGCTGAGGTTGTCCA R: TGAGATGAGCAGAACAACAGG	AB458985	<i>Poli1643TUF</i>	F: GGTGCGGTCCTCTTAACAAA R: GCGTAATCCACATTTGGAC	AB458986
<i>Poli1795TUF</i>	F: CCCAGCAGACCTTTCATGTT R: CATCCATTTGATGCTGTGTG	AB459082	<i>Poli193TUF</i>	F: CTCCCAACTGAAGTGGATTGTGTTT R: GTACACAAACCAAGCTCAGCTCAT	AB459463
<i>Poli907TUF</i>	F: CCACACTGTCGGCCTATTA R: GTGTTCCAGATGGACGGACT	EF112845	<i>Poli-RC27-TUF</i>	F: CCAATGCATCAATACGTACACA R: GAAGGGGTGCTATGAGATGG	AB030937
<i>Poli1327TUF</i>	F: GACAGGCTGAGTGGGAGAAC R: CCTGGCATAATTCTCCCCATA	EF113072	<i>Poli72MHFS</i>	F: TCGCTCCTTCTCTTGTCTC R: CTGCGGGAACACACACAC	AB459338
<i>Poli2031TUF</i>	F: TACATGCACTGCTGTTTCAAA R: GTGGAGGATGAAGTGATTGGAT	AB459267	<i>Poli1906TUF</i>	F: CAGCTGACTTGAGCGAAATG R: TTTCCAACATTTGGTGGGATT	AB459179
<i>Poli212TUF</i>	F: ATTTTAATTG CAGTACACC CCTCC R: CCTTCGTCTAATTAATTGACAAGTGCA	AB459478	<i>Poli1872TUF</i>	F: CCAGAGGACAGTTGGCTTTC R: GGAGCGACCACGTAGAAGAC	AB459147

表 2 72 个微卫星标记的连锁群、M-C 的遗传距离及所在区域
 Tab. 2 Linkage group, M-C map distance and located region of 72 microsatellite markers

位点 locus	连锁群 linkage group	M-C 距离/cM M-C distance	所在区域 located region	位点 locus	连锁群 linkage group	M-C 距离/cM M-C distance	所在区域 located region
<i>Poli784TUF</i>	LG1	20.30	连锁群中部	<i>Poli1446TUF</i>	LG13	42.95	远着丝粒
<i>Poli1181TUF</i>	LG1	27.10	连锁群中部	<i>Poli1797TUF</i>	LG13	49.20	远着丝粒
<i>Poli1076TUF</i>	LG1	43.75	远着丝粒	<i>Poli966TUF</i>	LG13	50.00	远着丝粒
<i>Poli824TUF</i>	LG2	11.70	近着丝粒	<i>Poli818TUF</i>	LG14	17.20	连锁群中部
<i>Poli866TUF</i>	LG2	45.30	远着丝粒	<i>Poli1260TUF</i>	LG14	25.00	连锁群中部
<i>Poli1077TUF</i>	LG2	50.00	远着丝粒	<i>Poli1819TUF</i>	LG14	34.40	远着丝粒
<i>Poli1431TUF</i>	LG3	22.65	连锁群中部	<i>Poli637TUF</i>	LG15	26.55	连锁群中部
<i>Poli1106TUF</i>	LG3	33.85	远着丝粒	<i>Poli9-8TUF</i>	LG15	48.45	远着丝粒
<i>Poli1831TUF</i>	LG3	48.45	远着丝粒	<i>Po13</i>	LG15	49.20	远着丝粒
<i>Poli1393TUF</i>	LG4	0.00	近着丝粒	<i>Poli1755TUF</i>	LG16	6.25	近着丝粒
<i>Poli1359TUF</i>	LG4	17.20	连锁群中部	<i>Poli1659TUF</i>	LG16	23.45	连锁群中部
<i>Poli148TUF</i>	LG4	47.65	远着丝粒	<i>Po25A</i>	LG16	50.00	远着丝粒
<i>Poli151TUF</i>	LG5	26.55	连锁群中部	<i>Poli1407TUF</i>	LG17	35.15	远着丝粒
<i>Poli1120TUF</i>	LG5	35.95	远着丝粒	<i>Poli127TUF</i>	LG17	35.95	远着丝粒
<i>Poli9TUF</i>	LG5	46.90	远着丝粒	<i>Poli1915TUF</i>	LG17	46.10	远着丝粒
<i>Poli1513TUF</i>	LG6	5.45	近着丝粒	<i>Poli1966TUF</i>	LG18	10.15	近着丝粒
<i>Poli134TUF</i>	LG6	13.30	近着丝粒	<i>Poli1864TUF</i>	LG18	22.65	连锁群中部
<i>Poli107TUF</i>	LG6	46.90	远着丝粒	<i>Poli1010TUF</i>	LG18	50.00	远着丝粒
<i>Poli1009TUF</i>	LG7	3.65	近着丝粒	<i>Poli975TUF</i>	LG19	12.50	近着丝粒
<i>Poli1801TUF</i>	LG7	28.15	连锁群中部	<i>Poli55MHFS</i>	LG19	29.70	连锁群中部
<i>Poli159TUF</i>	LG7	40.65	远着丝粒	<i>Poli1490TUF</i>	LG19	49.20	远着丝粒
<i>Poli1450TUF</i>	LG8	19.80	连锁群中部	<i>Poli1773TUF</i>	LG20	41.65	远着丝粒
<i>Poli1118TUF</i>	LG8	47.65	远着丝粒	<i>Poli1779TUF</i>	LG20	43.75	远着丝粒
<i>Poli1825TUF</i>	LG8	50.00	远着丝粒	<i>Poli1838TUF</i>	LG20	50.00	远着丝粒
<i>Poli1813TUF</i>	LG9	0.00	近着丝粒	<i>Poli1852TUF</i>	LG21	10.95	近着丝粒
<i>Poli1392TUF</i>	LG9	14.85	近着丝粒	<i>Poli1827TUF</i>	LG21	11.70	近着丝粒
<i>Poli1936TUF</i>	LG9	25.80	连锁群中部	<i>Poli1925TUF</i>	LG21	48.45	远着丝粒
<i>Poli753TUF</i>	LG10	5.75	近着丝粒	<i>Poli1451TF</i>	LG22	0.00	近着丝粒
<i>Poli1412TUF</i>	LG10	36.70	远着丝粒	<i>Poli1579TUF</i>	LG22	14.05	近着丝粒
<i>Po15</i>	LG10	44.55	远着丝粒	<i>Poli1498TUF</i>	LG22	47.40	远着丝粒
<i>Poli1642TUF</i>	LG11	0.80	近着丝粒	<i>Poli1643TUF</i>	LG23	28.15	连锁群中部
<i>Poli1795TUF</i>	LG11	19.55	连锁群中部	<i>Poli193TUF</i>	LG23	46.10	远着丝粒
<i>Poli907TUF</i>	LG11	33.85	远着丝粒	<i>Poli-RC27-TUF</i>	LG23	50.00	远着丝粒
<i>Poli1327TUF</i>	LG12	21.90	连锁群中部	<i>Poli72MHFS</i>	LG24	0.00	近着丝粒
<i>Poli2031TUF</i>	LG12	25.00	连锁群中部	<i>Poli1906TUF</i>	LG24	26.05	连锁群中部
<i>Poli212TUF</i>	LG12	47.40	远着丝粒	<i>Poli1872TUF</i>	LG24	49.20	远着丝粒

1.4 PCR 反应及电泳

PCR 反应体系为 15 μL , 包括: 10 \times Buffer 2.5 μL 、 Mg^{2+} (25 mmol/L) 1 μL 、dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μL 、上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.6 μL 、模版 1 μL (30 ~ 50 ng)、*Taq* DNA 聚合酶 1 U, 加适量 ddH₂O。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性

3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 25 个循环, 最后延伸 10 min, PCR 扩增利用 AB9700 型 PCR 仪完成。PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电泳后用 1% 硝酸银染色 10 min, 显色液显色 10 min。凝胶在 HP scanjet G4010 扫描仪成像, Gel-Pro Analyzer 4.5

凝胶分析软件对电泳谱带进行数据采集和分析。

1.5 统计分析

根据 M-C 图距,将微卫星标记为近着丝粒、连锁群中部和远着丝粒 3 个区域。利用不同区域的标记进行基础群体的遗传分析,计算等位基因数 (number of alleles, A)、有效等位基因数 (number of effective alleles, N_e)、Shannon 多样性指数 (Shannon's information index, I)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、无偏倚杂合度期望值 (unbiased expected heterozygosity, H_e)、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (d) 和多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), 由 Popgene (Version 3.2) 软件统计这些指标。同时, 计算在 3 个区域性微卫星标记上基础群体内个体之间的遗传相似系数 (genetic similarity index, GSI) 和遗传距离 (genetic distance), 相应统计指标的计算公式为

$$\text{观测杂合度: } H_o = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 ;$$

$$\text{无偏倚杂合度期望值}^{[23]}: H_e = N(1 - \sum P_i^2)/(N - 1) ;$$

$$\text{Hardy-Weinberg 遗传偏离指数: } d = (H_o - H_e)/H_e ;$$

$$\text{多态信息含量}^{[24]}: PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 -$$

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

$$\text{遗传相似系数}^{[25]}: GSI = 2N_{xy}/(N_x + N_y) ;$$

$$\text{遗传距离}^{[26]}: GD = -\ln(GSI) ;$$

式中, n 表示某一座位上的等位基因数, N 表示样本数, P_i, P_j 表示某一座位第 i, j 个等位基因的频率, N_x, N_y 分别表示两个体 x, y 扩增出的总条带数, N_{xy} 表示两个体 x, y 共有的条带数。

2 结果

2.1 遗传多样性分析

利用近着丝粒、连锁群中部和远着丝粒区域的微卫星标记分别进行牙鲆渤海自然群体的遗传多样性分析, 统计在多态位点的遗传参数 (表 3)。由近着丝粒区域至远着丝粒区域, 等位基因数、有效等位基因数、Shannon 多样性指数和多态信息含量呈现递增的趋势, 但递增的幅度并不大, 4 个遗传统计指标在远着丝粒区域的最高值依次为 7.389、5.129、1.683 和 0.746。在远着丝粒区域, 观测杂合度和无偏倚杂合度期望值略高, 分别为 0.593 和 0.753; 其次为在近着丝粒区域, 这 2 个指标分别为 0.579 和 0.751; 在连锁群中部则表现略低, 分别为 0.568 和 0.738。Hardy-Weinberg 遗传偏离指数在远着丝粒区域为 -0.250, 在连锁群中部则为 -0.200。

表 3 自然群体的遗传统计指标

Tab. 3 Genetic statistical data observed in natural population

区域 region	等位 基因数 A	有效等位 基因数 N_e	Shannon 多样性指数 I	观测 杂合度 H_o	无偏倚杂合 度期望值 H_e	多态信 息含量 PIC	Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 d
近着丝粒 close to centromere	6.400	4.469	1.565	0.579	0.751	0.707	-0.230
连锁群中部 intermediate region of linkage group	6.579	4.787	1.595	0.568	0.738	0.743	-0.200
远着丝粒 far from centromere	7.389	5.129	1.683	0.593	0.753	0.746	-0.250

2.2 遗传结构分析

利用 3 个区域的多态性位点分别统计基础群体中个体之间的遗传相似系数和遗传距离。个体之间的遗传相似系数, 在连锁群中部区域略高, 为

0.38; 在近着丝粒区域次之, 为 0.366; 在远着丝粒区域略低, 为 0.356。个体之间的遗传距离, 在远着丝粒区域略高, 为 0.644; 在近着丝粒区域次之, 为 0.634; 在连锁群中部区域略低, 为 0.620。

表 4 自然群体内个体之间的遗传相似系数和遗传距离

Tab. 4 Genetic similarity index and genetic distance among offspring in natural population

区域 region	遗传相似系数 GSI	遗传距离 GD
近着丝粒 close to centromere	0.366	0.634
连锁群中部 intermediate region of linkage group	0.380	0.620
远着丝粒 far from centromere	0.356	0.644

3 讨论

自然群体是开展选择育种研究工作最为珍贵的种质资源,以此为基础,开展二代的多性状复合育种,众多的水产经济动物都已培育出新品种。准确解析群体的遗传结构,直接决定了家系的配组方案。本研究在 M-C 作图的基础上,选择连锁群上不同区域的微卫星标记分析了牙鲆渤海自然群体。等位基因数(A)、有效等位基因数(N_e)、Shannon 多样性指数(I)、观测杂合度(H_o)、无偏倚杂合度期望值(H_e)和多态信息含量(PIC)指标能够从多个方面反映出群体的遗传多样性。 A 的范围为 6.400~7.389,低于日本岩手野生牙鲆群体($A = 16.5$)^[27],与山东近海群体^[28]($A = 6.7$)和秦皇岛海域群体($A = 8.9$)^[16]基本相同。 I 反映了等位基因在群体中的分布是否均匀,其常规数值范围为 1.5~3.5^[29];本研究中的 I 值属于这一区间,表明等位基因在该群体中的分布较为均匀。杂合度是反映微卫星标记在群体中遗传变异程度的最优参数^[30]。本研究 H_e 的范围为 0.738~0.753,与威海野生群体($H_e = 0.716$)^[31]的结果基本相同,略低于山东近海自然群体($H_e = 0.812$)^[28]和秦皇岛海域野生群体($H_e = 0.840$)^[16]的结果,而高于用 AFLP 技术得到的荣成野生群体的杂合度($H_e = 0.123$)^[32]和由野生亲本繁殖的 5 个养殖群体(丹东、北戴河、威海、荣成和青岛)的杂合度($H_e = 0.5587 \sim 0.6482$)^[19]。 PIC 为衡量标记遗传信息含量高低的主要参数,当标记的 $PIC < 0.5$ 时,确定其为低、中度多态位点;当标记的 $PIC > 0.5$ 时,确定其为高度多态位点^[33]。本实验中 PIC 的范围为 0.707~0.746,表明所选用的微卫星标记具有高度多态性,可以用于分析牙鲆自然群体的遗传多样性。本研究获得的遗传参数指标具有较高的数值,说明该群体具备一定的选择潜力。实际上,尽管存在在特定范围可判定多样性是否丰富的文献,但单纯这样的数值也仅为判定自然群体参考数据是否好。举例来说,一个群体只有 2 个等位基因,另一个群体有 10 个等位基因,其中 8 个等位基因稀有、频率低,某种特定个体组合将获得相同的多样性指数,但从育种角度,将选择从后者开始。实际上现在还很难将这些参数和群体适用性挂钩,这些参数只是一个评价。特别需要指出的是不能忽略稀有等

位基因,也就是等位基因数量,其应该占有更多的权重。以本研究中的 A 为例,渤海自然群体和日本、山东近海和秦皇岛海域群体进行了对比,其中能够比较的是选择的群体在多大程度上代表了野生或者可以获得、已经存在的群体遗传多样性。育种主要是选择已经存在的变异,如果能代表野生群体或者在选择程度上代表野生群体,就为一个好的选育基础群体。不同群体之间除了各种参数的直接比较以外,另一途径是遗传分化、分化程度等统计处理。本研究群体并未与上述 2 个中国群体进行直接的遗传分化比较,主要因为等位基因不对应,从而无法整合文献上的数据。如果想要整合不同来源(如时间和实验室)的数据,需要定义等位基因,即重复数量为多少。为此,可以测定等位基因序列,展示等位基因中微卫星重复次数的数据,用于结果对比研究。

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)能够反映观测杂合度和期望杂合度之间的动态平衡。 d 值为正值,表明基因型表现为杂合态的个体过剩; d 值为 0,表明基因型分布接近平衡; d 值为负值,表明基因型为杂合态的个体缺失^[34]。本研究结果中的 d 值略小于零,说明杂合态基因型个体缺失。引起缺失的因素主要有样本大小、无效基因、种群退化、性比失衡、近交衰退和人为原因所造成的稀有等位基因缺失等众多因素^[35]。在这些诱因中,可能影响本实验结果的因素首选为分析所用样本数量的多少。其次,虽然本研究群体中的亲鱼凭外观认定为野生个体,但也存在人工繁殖的后代流入海水中发育至成熟个体而被捕获的可能,这会直接影响群体的遗传结构组成;如果是全部雌性或雄性个体流入海水中,更将会造成群体的性别比例失去平衡。牙鲆实验群体内个体之间的遗传相似系数为 0.356~0.380,表明个体之间有一定的遗传相似性,推测群体中的部分个体可能来自于共同的祖先,从而提高了个体间的相似程度。同时,遗传距离范围为 0.620~0.644,表明多数个体之间具有相对较远的亲缘关系,应该来自于不同祖先。选择遗传距离较远的个体进行配组,产生的后代在理论上具有较强的杂交优势,此点可在制定育种方案时提供分子水平的预测,一些水产动物品种如团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[36]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[37]的实验已经验证了这一推论并获得了

较好的选育效果。

已经有多篇文献利用分子标记技术分析牙鲆野生群体或养殖群体的遗传结构,但在这些报道中所选择的标记均为随机选取,并没有定位标记在连锁群上距离着丝粒的相对位置。本研究利用连锁群上 3 个区域性微卫星标记分析牙鲆选育基础群体遗传多样性,结果显示远着丝粒、连锁群中部和近着丝粒 3 个区域标记获得的遗传指标数值之间只存在较小的差异,出现这样的差异,可能是标记数量小,选择形成的偏差。标记间的连锁距离在不同染色体区域可能有别,这与 DNA 组成有关,也与标记区域控制的功能(如性别决定)等有关,但与标记检测的遗传多样性高低没有必然的联系,本实验结果验证了这一推断。人工选择育种是一项漫长而艰巨的研究工作,伴随着选育目标性状由初期单一的生长性状逐步扩展到抗病、品质、生殖、性别、耐寒和耐低氧等多元化的性状^[38],对于群体遗传多样性的要求也越来越高。只有遗传变异足够丰富的群体,才有可能选育出符合养殖业不同需求的水产动物新品种。本研究分析的牙鲆渤海自然群体虽然具备一定的选育潜力,但所有个体均捕自渤海海域,群体结构较为单一,未来还应该继续引进日本、韩国和我国不同海域的个体,丰富选育群体的遗传组成,为下一步开展多性状复合育种研究积累宝贵的素材。

参考文献:

- [1] 侯仕营,马爱军,王新安,等. 大菱鲆 4 个引进地理群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 渔业科学进展,2011,32(1):16-23.
- [2] 陈淑吟,徐士霞,张志勇,等. 大黄鱼野生群体与养殖群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学,2011,35(12):82-87.
- [3] 陈省平,丁少雄,陈嘉慧,等. 赤点石斑鱼群体遗传结构的微卫星分析[J]. 中山大学学报:自然科学版,2012,51(3):83-89.
- [4] 王婷婷,宋学宏,许爱国,等. 应用微卫星标记分析 4 个黄颡鱼群体的遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):41-45.
- [5] 刘海情,郭昱嵩,王中锋,等. 利用微卫星分析吉富罗非鱼群体的遗传多样性[J]. 南京农业学报,2012,43(1):94-98.
- [6] 熊美华,史方,徐念,等. 微卫星标记分析乌江流域白甲鱼群体的遗传多样性[J]. 水生态学杂志,2009,2(2):122-125.
- [7] 贾舒雯,刘萍,李健,等. 脊尾白虾 3 个野生群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 水产学报,2012,36(12):1819-1825.
- [8] 韩智科,刘萍,李健,等. 三疣梭子蟹选育家系微卫星分析[J]. 水产学报,2012,36(1):25-31.
- [9] 王学颖,高远镇,杜晓东,等. 马氏珠母贝金黄壳色系 F_3 和基础群体遗传结构比较[J]. 海洋通报,2012,31(3):324-328.
- [10] Li Q, Yu H, Yu R H. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. Aquaculture, 2006,259(1-4):95-102.
- [11] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京:中国农业出版社,2011:482-483.
- [12] 田永胜,陈松林,徐田军,等. 牙鲆不同家系生长性能比较及优良亲本选择[J]. 水产学报,2009,33(6):901-911.
- [13] 陈松林,田永胜,徐田军,等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定[J]. 水产学报,2008,32(5):665-673.
- [14] 刘永新. 牙鲆选育家系生长性状的遗传分析[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2009.
- [15] 王蕾,张立冬,万玉美,等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析[J]. 遗传,2010,32(10):1057-1064.
- [16] 马晓冰,王桂兴,刘海金,等. 秦皇岛海域野生牙鲆群体遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2012,19(6):963-969.
- [17] 邵长伟,廖小林,田永胜,等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析[J]. 渔业科学进展,2009,30(1):41-46.
- [18] 邹曙明,李思发,蔡完其,等. 牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异[J]. 中国水产科学,2001,7(4):6-9.
- [19] 刘海金,朱晓琛,孙效文,等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2008,15(1):30-37.
- [20] 徐田军,陈松林,田永胜,等. 牙鲆 4 个选择性繁育后代群体遗传结构的微卫星分析[J]. 渔业科学进展,2009,30(4):57-63.
- [21] Liu Y X, Han H Z, Wang Q L, et al. Choice of microsatellite markers for identifying homozygosity of mitotic gynogenetic diploids in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fish Biology, 2013,82(2):588-599.
- [22] 韩慧宗,蒋丽,刘奕,等. 基于 M-C 作图鉴定牙鲆不同二倍体的遗传特征[J]. 水产学报,2013,37(3):321-329.

- [23] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583 - 590.
- [24] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314 - 331.
- [25] 刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异 [J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 718 - 724.
- [26] 王晓清, 王志勇, 谢中国, 等. 大黄鱼(♀)与鲩(♂)杂交的遗传分析 [J]. *水产学报*, 2008, 32(1): 51 - 57.
- [27] Sekino M, Hara M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2002, 213(1 - 4): 101 - 122.
- [28] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 山东近海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(6): 530 - 537.
- [29] 徐成, 王可玲, 张培军. 鲈鱼群体生化遗传学研究 II. 种群生化遗传结构及变异 [J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(3): 248 - 254.
- [30] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. *Evolution*, 1975, 29(1): 1 - 10.
- [31] 陈微, 张全启, 于海洋, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 682 - 687.
- [32] 张全启, 徐晓斐, 齐洁, 等. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多样性分析 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2004, 34(5): 816 - 820.
- [33] McDonald, John Wiley. *Space, Time and Life* [M]. Seattle: University of Washington Press, 2003: 109 - 120.
- [34] 李鹏飞, 刘萍, 柳学周, 等. 漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(1): 13 - 19.
- [35] Antoro A, Na-Nakorn U, Koedprang W. Study of genetic diversity of orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(1): 17 - 26.
- [36] 曾聪, 张耀, 曹小娟, 等. 团头鲂 3 个地理种群杂交效果的配合力和微卫星标记预测 [J]. *水产学报*, 2012, 36(6): 809 - 814.
- [37] 王炳谦, 谷伟, 高会江, 等. 利用配合力和微卫星标记预测虹鳟品系间的杂交优势 [J]. *中国水产科学*, 2009, 16(2): 206 - 213.
- [38] 桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良 [J]. *科学通报*, 2012, 57(19): 1719 - 1729.

Analysis of genetic diversity in Bohai natural population of *Paralichthys olivaceus*

LIU Yongxin^{1*}, ZHU Yimei², LIU Yingjie², GAO Lei², FANG Hui²,
HAN Gang², WANG Yufen³, JIANG Xiufeng³, LIU Haijin^{3*}

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Animal Science and Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China)

Abstract: To analyze the genetic diversity of natural population and select the specific microsatellite markers for identifying effectively genetic characteristics of population in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in this study, seventy-four wild individuals captured from the Bohai Sea were used to form the experimental population. A set of 72 microsatellite markers located on different regions in linkage group were chosen to carry out the genetic analysis. In these markers, 17 were located in the centromeric region, 36 in the distant region from the centromere and 19 in the intermediate region of linkage groups. Analysis showed that the number of alleles (A) ranged from 6.400 to 7.389, number of effective alleles (N_e) ranged from 4.469 to 5.129 and Shannon's information index (I) ranged from 1.565 to 1.683 in different regions of linkage group. The observed heterozygosity (H_o), unbiased expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) was from 0.568 to 0.593, from 0.738 to 0.753 and from 0.707 to 0.746, respectively. The Hardy-Weinberg departure value (d) was lower than -0.200 , while, genetic distance (GD) among individuals in population was above than 0.620. Each genetic parameter demonstrated that there was richer genetic diversity in experimental population and relatively farther genetic distance among individuals. This population was suitable for conducting selective breeding as founder population. Significant difference did not exist in the genetic parameters obtained by microsatellite markers located on different regions in linkage group, which verified that there was no necessary correlation between the positions of marker located and the degree of genetic diversity of markers. However, these polymorphic markers could be used as marker candidates to analyze the genetic structure in population of Japanese flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; natural population; microsatellite; centromere

Corresponding author: LIU Yongxin. E-mail: liuyx@cafs.ac.cn;

LIU Haijin. E-mail: liuhaijin1951@126.com