



基于转录组数据的溪红点鲑微卫星标记筛选及引进群体遗传结构

郑先虎, 鲁翠云, 孙志鹏, 党红阳, 匡友谊,
曹顶臣, 白庆利, 孙效文*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室,
农业农村部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 为了深入了解引进溪红点鲑种质遗传结构状况, 本研究利用溪红点鲑转录组数据设计四核苷酸重复微卫星引物 1 081 对, 选择其中 200 对进行引物合成, 经过筛选鉴定共获得 111 个特异性好且扩增效率高的微卫星标记, 用其中 27 个多态性标记比较分析了溪红点鲑引进群体和养殖群体的遗传多样性。结果显示, 27 个微卫星位点在 2 个群体中共检测到 171 个等位基因, 多态性信息含量 (PIC) 为 0.426 0~0.877 4, 平均为 0.673 1, 其中 23 个位点高度多态 ($PIC \geq 0.5$)。引进群体和养殖群体的平均等位基因数 (N_a) 分别为 5.555 6 和 4.444 4; 平均有效等位基因数 (N_e) 分别为 3.914 5 和 3.108 2; 平均观测杂合度 (H_o) 分别为 0.356 2 和 0.265 0; 平均期望杂合度 (H_e) 分别为 0.700 2 和 0.621 0; 平均 PIC 分别为 0.640 9 和 0.555 5。引进群体和养殖群体的遗传参数 t 检验结果显示, 养殖群体的 5 项遗传多样性参数均显著或极显著低于引进群体, 表明尽管溪红点鲑养殖群体的 PIC 仍处于高度多态水平 ($PIC \geq 0.5$), 但是经过多代群体自繁, 已经出现等位基因严重富集的现象。经 Bonferroni 校正的 Hardy-Weinberg 平衡检验显示, 在引进群体和养殖群体中分别有 8 个和 4 个位点尚未偏离平衡, 且多数位点表现为杂合子缺失。2 个群体间具有高度遗传分化 ($F_{st}=0.164 2$), 遗传相似系数为 0.582 2, 遗传距离为 0.540 9, 表明引进和养殖溪红点鲑群体间存在显著遗传分化。

关键词: 溪红点鲑; 转录组; 微卫星标记; 引进群体; 遗传结构

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 又名美洲红点鲑、七彩鲑, 隶属鲑形目 (Salmoniformes), 鲑科 (Salmonidae), 红点鲑属, 原产于北美东北部, 2001 年引进我国后, 已成为重要的养殖新品种。该鱼生长速率快, 饲料利用率高, 市场潜力大, 经济效益好, 具有较高的经济价值。自引进以来, 由于受到生产规模等因素的限制, 大多数养殖苗种来自于自繁后代, 且经过多代的近交和多年生殖隔离, 养殖性状出现了不同程度的

退化, 如抗病力下降、性成熟个体变小等。有研究表明鱼类养殖群体相较于野生群体来说, 出现了不同程度的等位基因缺失, 造成遗传多样性明显下降, 从而导致了遗传潜力的下降^[1-3]。因此, 对溪红点鲑进行保种策略研究, 开展合理选育, 保护其种群的遗传多样性, 防止种质退化是养殖过程中需重视的问题。

目前, 我国引进的溪红点鲑的研究主要集中在繁育^[4-5]、苗种培育^[6]、养殖技术^[7-9], 以及生

收稿日期: 2019-09-19 修回日期: 2019-12-30

资助项目: 农业部“948”项目 (2016-X15); 国家水产种质资源平台 (2019DKA30470)

通信作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

物学^[10-11]等方面。经过多代繁殖后,对引进溪红点鲑种质的遗传结构状况缺乏深入了解。杨建宝等^[12]利用虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和哲罗鲑 (*Hucho taimen*) 微卫星标记进行跨物种扩增,筛选出 15 个标记对引进的溪红点鲑繁育的 F₃ 群体进行了遗传多样性分析,结果显示其平均多态性信息含量为 0.578,表明引进的溪红点鲑遗传多样性水平较高。谷伟等^[13]利用 4 个溪红点鲑和 3 个白斑红点鲑 (*S. leucomaenis*) 微卫星标记对溪红点鲑养殖群体、溪红点鲑和白斑红点鲑杂交群体进行遗传多样性分析,结果显示养殖群体和杂交群体均呈高度多态性水平。此外,King 等^[14]开发了 13 个溪红点鲑微卫星标记并用于 2 个野生群体遗传结构分析。总体来说,目前现有的溪红点鲑微卫星标记数量不足,尚不能满足开展溪红点鲑遗传学研究的需要。本研究利用公共数据库中溪红点鲑转录组数据,开展了四核苷酸重复微卫星标记的筛选,并利用这些标记对丹麦引进群体和养殖群体进行遗传多样性分析,以期对溪红点鲑的种质资源保护及开展合理选育提供依据,为溪红点鲑在我国可持续养殖提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验用溪红点鲑包含 2 个群体,均取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼类实验站。一个群体为 2017 年自丹麦引进的发眼卵,经孵化培育的 1 龄幼鱼群体(记为引进群体, Introduced),随机取样 30 尾;另一个群体为 2004 年引进自美国,经多年自群繁育形成的养殖群体(记为养殖群体, Cultured),从 2 龄鱼中随机取 38 尾。采集尾鳍样本,参照李超等^[15]方法保存于干燥环境中备用。

1.2 基因组 DNA 提取

剪尾鳍约 0.5 g,按照说明书的方法,使用 DNA 提取试剂盒(QIGEN)提取基因组 DNA,使用 NanoDrop™ 8000 分光光度计检测所提取 DNA 的 OD 值及浓度,并使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,随后转入 -20 °C 保存备用。

1.3 微卫星引物设计与筛选

从 NCBI 数据库获取溪红点鲑转录组数据(登录号:SRP058862)^[16],利用本实验室开发的

<https://www.china-fishery.cn>

基于 NGS 的微卫星基因型鉴定软件 1.0(登记号:2017SR530430)进行四核苷酸重复微卫星序列的识别和引物设计。对引物进行梯度退火温度筛选,摸索最佳退火温度,利用引进和养殖群体中各 5 尾个体对引物特异性和多态性进行初步检测。建立 15 μL PCR 反应体系,包括 10 mmol/L Tris-Cl(pH=8.0)、50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTP、上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、Taq DNA 聚合酶 1 U (TaKaRa)、DNA 模板(50 ng/μL) 2 μL,补灭菌水至 15 μL。PCR 反应程序:94 °C 3 min; 94 °C 30 s,退火温度 30 s,72 °C 30 s(25 个循环); 72 °C 5 min。PCR 产物通过 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,0.1% 硝酸银染色。以 DL500(TaKaRa)为标准分子量,用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带,根据每个个体产生的条带位置确定其基因型。

1.4 数据分析

利用 Popgene 1.32 软件(https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html)计算各微卫星位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 指数和 F -统计量,以及 Nei 氏标准遗传距离(D_s)等指标。由 Botstein 等^[17]公式计算多态性信息含量(PIC),公式:

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

式中, n 为某一位点上等位基因数, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j=i+1$ 。

用 SPSS 19.0 软件对 2 个群体遗传多样性参数进行配对样本 t 检验。群体 Hardy-Weinberg 平衡用 χ^2 检验估计。用 NeEstimator (version 2.1)^[18] 软件,采用连锁不平衡(linkage disequilibrium)方法估算养殖群体和引进群体的有效群体大小。

利用 Arlequin 3.11 软件^[19]中的分子方差分析(AMOVA)计算群体间的遗传分化系数(F_{st})及遗传变异组成。用“鱼类种质资源遗传分析装置(专利号:ZL200710144749.3)”处理个体间遗传数据,将其转换为 PHYLIP 3.6 软件识别的数据格式,用 Gendist 程序计算个体间遗传距离,用 Neighbor 程序绘制基于邻接法(Neighbor-Joining, NJ)的聚类图。

2 结果

2.1 微卫星引物设计及多态性筛选

根据溪红点鲑转录组数据,针对四核苷酸

重复微卫星序列进行引物设计, 成功设计出 1 081 对引物, 包括 26 种核心序列类型 (表 1), 其中以 (ACAG)_n 重复类型最为丰富, 其次为 (ACAT)_n 和 (ACGC)_n。选择重复 5 次以上的微卫星序列合成 200 对引物。经过退火温度筛选, 有 111 对能够扩增出稳定条带, 对 2 个群体共 10 尾个体中检测发现, 仅有 27 对具有多态性, 多态性比例为 24.32%。27 对微卫星标记引物相关信息见表 2。

表 1 溪红点鲑 1 081 对微卫星引物的重复序列类型及比例

Tab. 1 Repeat motif types and proportion of 1 081 pairs of microsatellite primers in *S. fontinalis*

重复序列类型 repeat motif type	数目 number	比例/% proportion
(ACAG) _n	416	38.48
(ACAT) _n	90	8.33
(ACGC) _n	82	7.59
(ACTG) _n	72	6.66
(ACTC) _n	61	5.64
(ATCC) _n	46	4.26
(AGCC) _n	41	3.79
(AGAT) _n	35	3.24
(AGGC) _n	33	3.05
(AAGG) _n	32	2.96
(AATC) _n	30	2.78
(AAAG) _n	24	2.22
(ACCT) _n	21	1.94
(AACC) _n	17	1.57
(AAAT) _n	16	1.48
(AGGG) _n	14	1.30
(ACGG) _n	11	1.02
(AAAC) _n	10	0.93
(AACT) _n	8	0.74
(ACCG) _n	5	0.46
(AGCT) _n	5	0.46
(AACG) _n	4	0.37
(AATG) _n	4	0.37
(ACGT) _n	2	0.19
(ATGC) _n	1	0.09
(ACCC) _n	1	0.09

2.2 群体遗传结构分析

筛选的 27 个微卫星标记均能在溪红点鲑 2 个群体中扩增出稳定、清晰的 DNA 条带, 条带大小为 95~490 bp, 共检测到 171 个等位基因, 每个标记检测的 N_a 为 3~11 个, 平均为 6.333 3; PIC 为 0.426 0~0.877 4, 平均为 0.673 1, 其中高度多态标记 23 个 ($PIC \geq 0.5$)。27 个微卫星标记在所检测的溪红点鲑引进群体和养殖群体中均有良好的多态性。引进群体 N_a 为 2~10, 平均为 5.555 6; N_e 为 1.628 2~7.157 4, 平均为 3.914 5; 香依多样性指数 (I) 为 0.690 9~2.113 1, 平均为 1.399 4。养殖群体 N_a 为 2~9, 平均为 4.444 4; N_e 为 1.429 7~6.663 2, 平均为 3.108 2; I 为 0.477 7~2.011 8, 平均为 1.156 3。对引进群体和养殖群体的 N_a 、 N_e 和 I 分别进行成对样本 t 检验, 结果显示养殖群体的 N_a 和 I 均极显著低于引进群体 ($P < 0.01$), 而 N_e 也显著低于引进群体 ($P < 0.05$), 表明养殖群体经过多代自繁, 已经出现等位基因的富集。引进群体的 H_o 为 0~0.833 3, 平均为 0.356 2, 其中 SFE036 位点的 H_o 为 0; H_e 为 0.392 9~0.875 4, 平均为 0.700 2; PIC 为 0.356 6~0.845 6, 平均为 0.640 9。养殖群体的 H_o 为 0~0.722 2, 平均为 0.265 0, 其中 4 个标记 (SFE006、SFE064、SFE069 和 SFE087) 的 H_o 为 0; H_e 为 0.304 6~0.861 9, 平均为 0.621 0; PIC 为 0.255 4~0.832 8, 平均为 0.555 5。成对样本 t 检验结果显示, 养殖群体的 H_o 、 H_e 和 PIC 均显著低于引进群体 ($P < 0.05$)。结果表明虽然溪红点鲑养殖群体的 PIC 仍处于高度多态水平 ($PIC \geq 0.5$), 但是相对于引进群体, 遗传多样性参数已经出现显著降低。用 NeEstimator 软件, 采用连锁不平衡方法估算养殖群体的有效群体大小为 13.4 尾 ($CI_{95\%}$), 引进群体为 52.8 尾, 引进群体的有效群体大小是养殖群体的 4 倍, 表明养殖群体经过多年群体繁殖, 实际保留的群体已经非常小。

对 27 个微卫星位点进行 Hardy-Weinberg 平衡分析, 用 Bonferroni 方法校正显著性阈值后, 引进群体中有 8 个标记符合遗传平衡; 而养殖群体中仅有 4 个标记符合遗传平衡。不符合遗传平衡的位点均表现为杂合子显著或极显著不足。部分电泳结果见图 1。具体数据统计结果见表 3。

2.3 群体间遗传关系

用 Arlequin 3.11 软件计算溪红点鲑群体的总

表 2 溪红点鲑微卫星引物序列及扩增信息

Tab. 2 Primer sequences and amplification information of *S. fontinalis*

位点 locus	正向引物序列 (5'-3') forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') reverse primer sequence (5'-3')	重复单元 repeat motif	退火温度/°C T_m	片段大小/bp fragment size
SFE004	ctgtgctactcgtcaccat	tcgcccattgtcacttacc	(atcc) ₉	60	95~115
SFE006	tagtaccgtacgcccagta	catgtacatggccagggtt	(acag) ₆	60	100~110
SFE019	gtgagtgactgagtgagcgg	gccaaactcaaggccagggt	(actc) ₂₀	61	130~180
SFE024	agcatgcagacacctccaaa	ctaggtctggccctgtttg	(aacc) ₇	60.5	105~115
SFE025	accaaaagtccttactctgtct	acctttgtgaccttcttgc	(acgc) ₇	60	150~175
SFE036	gcccagtgaaatgcttgaca	ccaagggtcactgtggagac	(acag) ₉	60	120~200
SFE037	accaaaagtccttactctgtct	tgtgaccttctgtcatgaa	(acgc) ₉	59	135~200
SFE046	tggacagaaaacagcaggca	tcctctcctctccaaacc	(acag) ₁₀	61	120~200
SFE049	cagcagctacagaggcatgt	acgtacagctcaagtgaaccc	(aaac) ₆	60	100~105
SFE054	aggtgacaatacagtggtgga	aagtcaactctgtcccgtg	(agcc) ₆	60	155~490
SFE056	ggttggtggtgaaattgtgca	actatgtggaagcagtagcct	(aaag) ₆	59	110~300
SFE059	gcttgaaatacagcgagg	gcagatgatgctaactcca	(aacc) ₁₈	62	135~155
SFE064	gtggagatggaaccagactca	ggccttggccaatgggta	(actg) ₆	59	130~135
SFE068	gggttcaccagttacttccca	tggttatgtcccaagtagcacc	(atcc) ₉	60	135~145
SFE069	aggctgggttctgtacagc	tcctcccacatctctcga	(aatc) ₆	60	130~140
SFE070	agcttgttctctcagacggc	ccaacactgagcactgtgc	(acgc) ₇	60	130~150
SFE075	tagttccagagagaccgca	ctgcatgctacacacgc	(actc) ₆	60	95~115
SFE081	tcctcacccttactact	aactcattgtgggtccttt	(actc) ₃₆	59	185~235
SFE087	gtctgctgctctccagaa	agctgcatctcccacatcag	(acag) ₉	60.5	115~120
SFE091	catgagtgccatgctggact	gacgaggaggagctcattg	(aatc) ₇	61	140~160
SFE094	atggatgaaggagggtcgga	cggagctgaaatcccactct	(atcc) ₁₉	60	110~145
SFE095	caccgccacaaaacaatcc	agatgagcataacaaggtagcct	(agat) ₁₇	61	200~280
SFE108	acgcaggagaaaagcaagtga	gctgtgtcagaactggtcgt	(aaag) ₁₉	61	125~145
SFE113	ccctctccctatggtataaacc	aaacatctccagcagctg	(acag) ₆	61.5	170~210
SFE121	accctgcatctcctttgtgt	agtgtgaggggatagccat	(aagg) ₁₄	61	120~130
SFE142	acctgcacagtgtttcagact	ccaacactgagtgttcttgtgt	(acag) ₁₇	61	110~145
SFE153	acgtgagacagacagcgtg	tgtgccaccgttcttattga	(acag) ₂₇	61.5	170~280

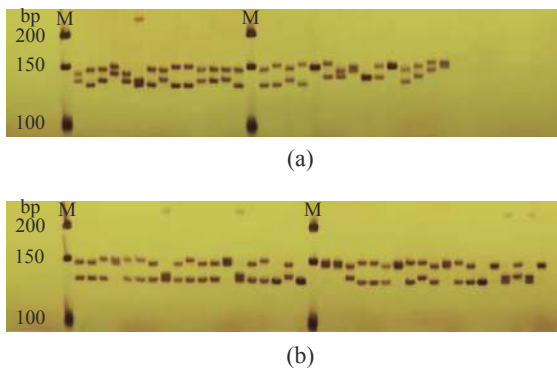


图 1 溪红点鲑引进群体和养殖群体在微卫星标记 SFE068 的电泳图谱

M. 分子量标准 DL500; (a) 引进群体; (b) 养殖群体

Fig. 1 Electrophoresis pattern of introduced and cultured populations at locus SFE068

M. molecular weight standard DL500; (a) introduced population; (b) cultured population

近交系数 (F_{it}) 为 0.622 1、群体内近交系数 (F_{is}) 为 0.5479、群体间分化系数 (F_{st}) 为 0.1642 ($F_{st} > 0.15$), 分子方差分析 (AMOVA) 的结果表明群体间具有高度显著的遗传分化, 16.42% 的遗传变异来自群体间 (表 4), 且群体内杂合子缺失显著。引进群体与养殖群体间的遗传相似系数为 0.582 2, 群体间的遗传距离为 0.540 9, 基于 NJ 方法的个体间聚类图也表明引进群体 (Introduced) 和养殖群体 (Cultured) 位于 2 个不同的分支 (图 2)。

3 讨论

3.1 微卫星标记的筛选及多态性

微卫星标记具有多态性高、保守性好、呈共显性遗传等特点, 其既能够用平板电泳又适合高通量平台的检测优势允许不同条件的研究

表 3 溪红点鲑 2 个群体在 27 个微卫星位点的多样性指数

Tab. 3 Genetic diversity indices of 27 microsatellite DNA markers for the two populations of *S. fontinalis*

位点 locus	引进群体 introduced population							养殖群体 cultured population							总群体 all						
	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC	P_{HWE}	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC	P_{HWE}	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC	P_{HWE}
SFE004	5	3.441 7	1.403 0	0.500 0	0.721 5	0.668 9	0.010 7	4	2.012 5	0.943 9	0.289 5	0.509 8	0.460 2	0.000 5*	5	2.571 0	1.202 5	0.382 4	0.615 6	0.569 6	0.000 0**
SFE006	4	2.571 4	1.065 8	0.300 0	0.621 5	0.533 0	0.000 8*	3	2.022 4	0.870 4	0.000 0	0.512 3	0.450 7	0.000 0**	4	2.393 4	1.022 1	0.132 4	0.586 5	0.520 4	0.000 0**
SFE019	7	3.805 4	1.550 0	0.413 8	0.750 2	0.697 0	0.056 8	7	2.995 6	1.391 9	0.405 4	0.675 3	0.626 9	0.000 0**	7	3.718 3	1.572 2	0.409 1	0.736 6	0.696 9	0.000 0**
SFE024	4	2.816 9	1.116 5	0.100 0	0.655 9	0.576 6	0.000 0**	3	2.105 0	0.796 2	0.105 3	0.531 9	0.412 1	0.000 0**	4	2.605 8	1.040 5	0.102 9	0.620 8	0.538 2	0.000 0**
SFE025	8	6.825 8	1.990 4	0.826 1	0.872 5	0.836 2	0.468 2	3	1.731 4	0.758 7	0.342 1	0.428 1	0.384 3	0.003 4	10	3.538 8	1.744 0	0.524 6	0.723 3	0.700 2	0.000 0**
SFE036	3	2.381 0	0.943 3	0.000 0	0.589 8	0.491 8	0.000 0**	3	2.106 5	0.875 7	0.184 2	0.532 3	0.453 3	0.000 0**	3	2.337 1	0.931 3	0.102 9	0.576 4	0.484 7	0.000 0**
SFE037	9	6.818 2	2.045 5	0.766 7	0.867 8	0.837 2	0.142 3	8	6.016 7	1.886 3	0.526 3	0.844 9	0.812 3	0.000 0**	10	7.458 1	2.144 9	0.632 4	0.872 3	0.852 2	0.000 0**
SFE046	7	3.796 1	1.547 9	0.363 6	0.753 7	0.697 3	0.032 4	4	2.845 3	1.140 0	0.236 8	0.657 2	0.583 7	0.000 0**	8	3.913 0	1.530 1	0.283 3	0.750 7	0.700 2	0.000 0**
SFE049	4	1.628 2	0.756 6	0.107 1	0.392 9	0.356 6	0.000 0**	2	1.845 4	0.650 6	0.026 3	0.464 2	0.353 2	0.000 0**	4	2.134 8	0.848 5	0.060 6	0.535 6	0.426 0	0.000 0**
SFE054	4	3.009 6	1.231 4	0.107 1	0.679 9	0.616 1	0.000 0**	3	2.357 6	0.971 7	0.026 3	0.583 5	0.512 3	0.000 0**	4	2.642 4	1.127 0	0.060 6	0.626 3	0.565 8	0.000 0**
SFE056	3	2.542 4	0.993 4	0.266 7	0.616 9	0.522 9	0.000 0**	3	2.111 1	0.839 3	0.105 3	0.533 3	0.432 8	0.000 0**	3	2.323 6	0.922 8	0.176 5	0.573 9	0.479 5	0.000 0**
SFE059	7	5.750 8	1.834 7	0.833 3	0.840 1	0.803 1	0.039 2	3	2.551 7	1.001 8	0.270 3	0.616 4	0.528 7	0.000 0**	7	4.507 0	1.658 6	0.522 4	0.784 0	0.745 2	0.000 0**
SFE064	4	2.162 8	1.012 6	0.142 9	0.547 4	0.495 6	0.000 0**	2	1.780 2	0.630 1	0.000 0	0.444 3	0.342 2	0.000 0**	4	2.362 3	0.973 9	0.061 5	0.581 2	0.485 4	0.000 0**
SFE068	5	3.887 7	1.457 4	0.533 3	0.755 4	0.699 8	0.000 7*	3	2.953 6	1.090 9	0.486 5	0.670 5	0.587 5	0.010 1	5	4.154 6	1.483 5	0.507 5	0.765 0	0.717 7	0.000 0**
SFE069	3	1.849 9	0.762 4	0.100 0	0.467 2	0.390 4	0.000 0**	3	2.481 1	0.981 3	0.000 0	0.604 9	0.515 7	0.000 0**	5	4.108 4	1.492 1	0.044 1	0.762 2	0.715 9	0.000 0**
SFE070	9	5.247 8	1.918 7	0.466 7	0.823 2	0.789 5	0.000 0**	5	3.810 0	1.452 7	0.394 7	0.747 4	0.695 6	0.000 0**	9	5.604 8	1.906 2	0.426 5	0.827 7	0.799 0	0.000 0**
SFE075	5	3.536 3	1.404 3	0.666 7	0.729 4	0.673 1	0.000 5*	5	3.716 9	1.403 9	0.526 3	0.740 7	0.682 1	0.005 7	5	4.433 4	1.538 7	0.588 2	0.780 2	0.737 5	0.000 0**
SFE081	6	4.186 0	1.522 3	0.266 7	0.774 0	0.720 9	0.000 0**	7	5.408 2	1.776 6	0.289 5	0.826 0	0.790 3	0.000 0**	11	8.578 8	2.223 4	0.279 4	0.890 0	0.871 9	0.000 0**
SFE087	3	1.909 2	0.801 0	0.069 0	0.484 6	0.410 8	0.000 0**	2	1.429 7	0.477 7	0.000 0	0.304 6	0.255 4	0.000 0**	3	2.429 8	0.960 8	0.029 9	0.592 9	0.502 6	0.000 0**
SFE091	5	2.960 5	1.300 8	0.133 3	0.673 4	0.621 2	0.000 0**	5	3.346 5	1.349 3	0.421 1	0.710 5	0.650 2	0.000 3**	9	5.478 7	1.880 6	0.294 1	0.823 5	0.794 1	0.000 0**
SFE094	7	5.471 1	1.802 4	0.266 7	0.831 1	0.793 0	0.000 0**	6	3.298 8	1.400 4	0.162 2	0.706 4	0.646 3	0.000 0**	9	5.531 7	1.899 3	0.209 0	0.825 4	0.796 8	0.000 0**
SFE095	8	6.185 6	1.941 7	0.700 0	0.852 5	0.818 9	0.213 8	7	5.245 2	1.798 6	0.621 6	0.820 4	0.785 8	0.024 2	8	5.985 3	1.926 0	0.656 7	0.839 2	0.813 6	0.013 1
SFE108	2	1.991 2	0.690 9	0.333 3	0.506 2	0.373 9	0.057 1	5	4.704 5	1.578 8	0.351 4	0.798 2	0.753 6	0.000 0**	5	4.183 6	1.513 3	0.343 3	0.766 7	0.722 6	0.000 0**
SFE113	8	6.000 0	1.937 2	0.300 0	0.847 5	0.814 7	0.000 0**	6	1.484 8	0.698 4	0.135 1	0.331 0	0.305 4	0.000 9*	8	3.382 8	1.598 5	0.209 0	0.709 7	0.680 1	0.000 0**
SFE121	3	2.132 7	0.815 6	0.066 7	0.540 1	0.421 1	0.000 0**	2	1.994 5	0.691 8	0.105 3	0.505 3	0.374 3	0.000 0**	3	2.679 0	1.039 1	0.088 2	0.631 4	0.553 8	0.000 0**
SFE142	7	5.625 0	1.824 8	0.366 7	0.836 2	0.798 5	0.000 0**	7	4.903 2	1.751 2	0.421 1	0.806 7	0.770 2	0.000 0**	7	6.526 5	1.912 7	0.397 1	0.853 1	0.827 9	0.000 0**
SFE153	10	7.157 4	2.113 1	0.620 7	0.875 4	0.845 6	0.000 7*	9	6.663 2	2.011 8	0.722 2	0.861 9	0.832 8	0.000 1**	11	8.932 3	2.272 9	0.676 9	0.894 9	0.877 4	0.000 0**
平均值 average		5.555 6	3.914 5	1.399 4	0.356 2	0.700 2	0.640 9		4.444 4	3.108 2	1.156 3	0.265 0	0.621 0	0.555 5		6.333 3	4.241 3	1.495 0	0.303 8	0.723 9	0.673 1

注: N_a 等位基因数, N_e 有效等位基因数, H_o 观测杂合度, H_e 期望杂合度, PIC 多态性信息含量, P_{HWE} Hardy-Weinberg 平衡检验阈值
Notes: N_a : allele number, N_e : effective allele number, H_o : observed Heterozygosity, H_e : expected Heterozygosity, PIC : polymorphism index content, P : P -value for Hardy-Weinberg test. *: $P < 0.001$; **: $P < 0.0004$

者使用, 在遗传学相关研究中得到了广泛地应用。微卫星标记的应用一度受限于开发成本较高, 近年来, 随着测序技术的进步, 公共数据库中基因组、转录组数据增加迅速, 便于从中筛选微卫星标记。由于四核苷酸重复的微卫星

标记具有更高的多态性、稳定性、在自动化分析中不易产生结巴带等优势, 受到越来越多的研究者青睐。Lindqvist 等^[20] 研究发现三、四核苷酸重复的微卫星标记比双核苷酸重复的微卫星标记更适合用于荧光标记进行大规模的自动

表 4 基于 27 个微卫星标记的分子方差分析结果

Tab. 4 Result of AMOVA based on 27 microsatellite markers

变异来源 source of variation	自由度(df) degree of freedom	平方和 sum o square	方差分量 variance component	总变异百分比/% percent of total variation
群体间 among populations	1	118.975	1.587 60	16.42
群体内个体间 among individuals within populations	66	825.775	4.428 67	45.79
个体内 within individuals	68	248.500	3.654 41	37.79
总数 total	135	1 193.250	9.670 68	

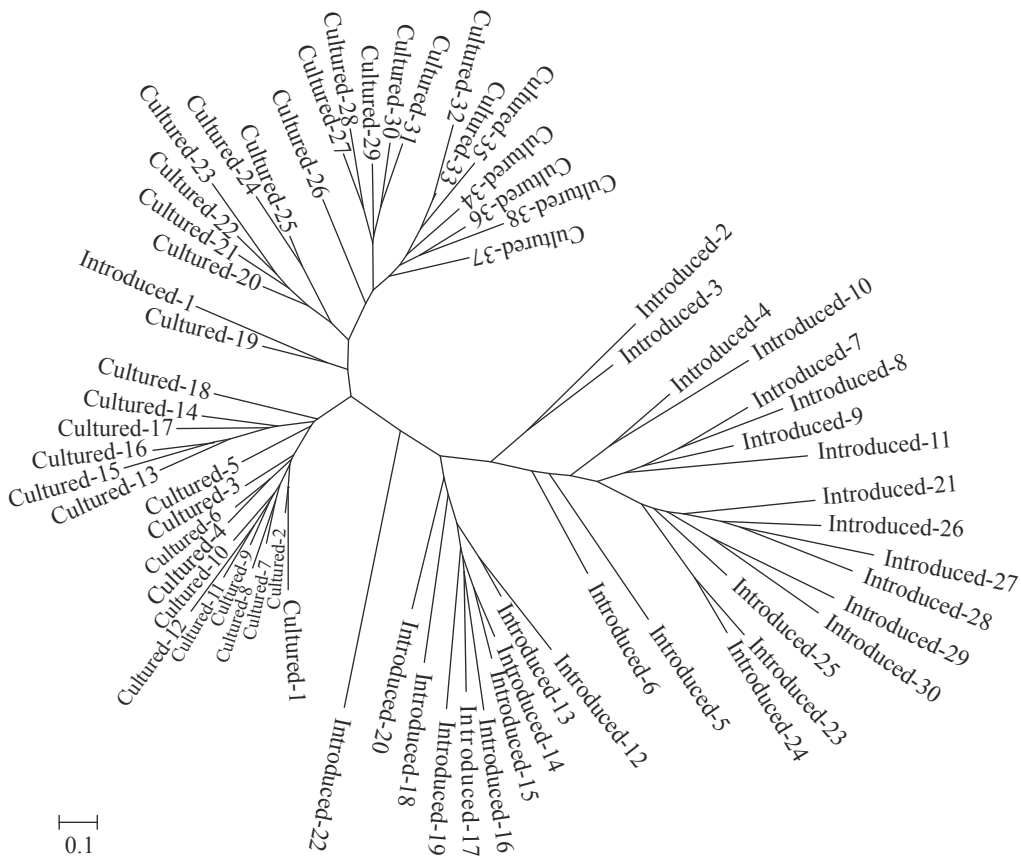


图 2 基于 NJ 算法的溪红点鲑个体间聚类图

Introduced. 引进群体; Cultured. 养殖群体

Fig. 2 Individual clustering map based on NJ of *S. fontinalis*

Introduced. introduced population; Cultured. cultured population

分析。鲁翠云等^[21]研究结果也表明, 鲤 (*Cyprinus carpio*) 中三、四核苷酸重复的微卫星标记具有更高的多态性。Tóth 等^[22]的统计结果表明在脊椎动物基因组中微卫星四核苷酸重复以 GATA/AGAT 最为普遍, 其后许多物种的微卫星富集也多以 GATA/AGAT 作为探针。本研究从溪红点鲑转录组数据中筛选并设计四核苷酸重复微卫星引物 1 081 对, 最丰富的是 (ACAG)_n, 占 38.48%, 而 (AGAT)_n 仅占 3.24%, 这可能与微卫

星序列的查找标准及物种特异性有关, 一般认为重复单元次数在 3 次及以上就可以判定为微卫星序列, 而重复次数的增加会提高多态性的筛选比例, 因此不同的研究者根据实验目的不同会设定不同的查找标准; 而不同物种的四核苷酸微卫星的重复类型也有差异, 例如马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) EST 数据库中, (ATTT)_n 占四核苷酸重复微卫星的 50%^[23]。在合成引物的 200 个标记中, 111 个扩增出稳定条带, 但是仅

27 个表现出多态性, 多态性比例为 24.32%。研究表明来源于基因组的微卫星标记多态比例高于来源于转录组的微卫星标记多态性^[24], 但是因其来源于基因表达的区域, 便于筛选和鉴定候选基因, 在性状关联分析中具有较大的应用空间。

3.2 引进种群的遗传结构变化

溪红点鲑生长快, 相同养殖条件下较虹鳟快 10%~12%^[9], 自引入我国后已成为重要的养殖新品种, 具有很大的市场潜力。本研究分析的养殖群体为 2004 年引进自美国的发眼卵, 经过多年多代的自群繁育形成的养殖群体; 而引进群体为 2017 年引进自丹麦的发眼卵培育的幼鱼, 对其开展遗传潜力评估是持续利用的种质资源前提和保障。用 27 个微卫星标记分析的养殖群体的平均 N_a 、 N_e 、 H_e 、 PIC 分别为 4.444 4、3.108 2、0.621 0 和 0.555 5; 引进群体分别为 5.555 6、3.914 5、0.700 2 和 0.640 9, 养殖群体的遗传多态性水平与杨建宝等^[12]的分析结果相近, 而显著低于引进群体。值得关注的是养殖群体和引进群体的平均 H_o 分别为 0.265 0 和 0.356 2, 远低于杨建宝等^[12]的分析结果 ($H_o=0.588$), 部分标记的个体均为纯合子, 表明溪红点鲑养殖群体和引进群体虽然保持了较高的遗传多态性水平 ($PIC>0.5$), 但是杂合子缺失严重, 而养殖群体相对于引进群体的遗传多样性已经出现显著地降低。由于引种地不同, 2 个群体遗传分化中度, 遗传差异较大, 个体间聚类结果也显示出相似的趋势。研究表明相对于野生群体或引进群体, 虹鳟^[25]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[26]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[1]、鲤^[2] 等鱼类的养殖群体的遗传多样性有不同程度地下降, 一般认为是建群者效应或选育过程中引起稀有等位基因的丢失造成。

3.3 溪红点鲑保种及繁殖建议

目前, 用于水产养殖目的的引进种多来源于商业购入的亲本、发眼卵、苗种等, 虽然引进的数量较大, 但是其遗传背景不清, 可能仅为来源于几个家系的苗种。受到建群者效应、生产规模和人工选择的影响, 遗传资源非常有限, 因而在育种实践中存在极高的近亲交配的风险, 养殖几代后容易出现遗传退化、病害频发等问题。作为名贵的冷水性鱼类, 溪红点鲑在加拿大、美国、芬兰、丹麦、挪威等地均有

分布^[13], 本研究分析的 2 个群体分别引自美国和丹麦, 群体间遗传分化较大, 将其进行杂交选育可能是提高遗传多样性水平, 保持种群遗传潜力的有效方法之一。同时, 建议建立基于分子标记的亲本基因型档案, 根据亲本遗传距离和亲缘关系设计繁殖配组方案, 避免近亲交配, 使子代能够继承亲本的遗传变异, 产生具有丰富遗传多样性的后代, 保持优良性状的稳定遗传, 通过科学选育不断提高子代生产性能, 从而延长良种的寿命。

参考文献 (References):

- [1] 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.
Zhang Z W, Cao Z M, Yang H, et al. Microsatellites analysis on genetic variation between wild and cultured populations of *Ctenopharyngodon idella*[J]. Zoological Research, 2006, 27(2): 189-196(in Chinese).
- [2] Kohlmann K, Kersten P, Flajshans M. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations[J]. *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 253-266.
- [3] 梁素娴, 孙效文, 白俊杰, 等. 微卫星标记对中国引进加州鲈养殖群体遗传多样性的分析[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 694-700.
Liang S X, Sun X W, Bai J J, et al. Genetic analysis for cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China with microsatellites[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(5): 694-700(in Chinese).
- [4] 田照辉, 徐绍刚, 杨贵强, 等. 溪红点鲑人工繁殖技术研究[J]. 水产科技情报, 2009, 36(4): 160-162.
Tian Z H, Xu S G, Yang G Q, et al. Artificial propagation technology of *Salvelinus fontinalis*[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2009, 36(4): 160-162(in Chinese).
- [5] 李建兴, 白庆利, 贾钟贺. 美洲红点鲑人工孵化和苗种培育的初步报道[J]. 黑龙江水产, 2011(1): 5-6.
Li J X, Bai Q L, Jia Z H. Preliminary report on artificial incubation and seedling cultivation of *Salvelinus fontinalis*[J]. Fisheries of Heilongjiang, 2011(1): 5-6(in Chinese).
- [6] 徐绍刚, 杨晓飞, 代国庆, 等. 美洲红点鲑苗种培育技术[J]. 中国水产, 2014(3): 77-78.

- Xu S G, Yang X F, Dai G Q, *et al.* The fry rearing technique of *Salvelinus fontinalis*[J]. *China Fisheries*, 2014(3): 77-78(in Chinese).
- [7] 杨贵强, 徐绍刚, 王跃智, 等. 温度和摄食对溪红点鲑幼鱼呼吸代谢的影响[J]. *应用生态学报*, 2009, 20(11): 2757-2762.
- Yang G Q, Xu S G, Wang Y Z, *et al.* Effects of water temperature and feeding on respiratory metabolism of juvenile *Salvelinus fontinalis*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(11): 2757-2762(in Chinese).
- [8] 徐绍刚, 杨贵强, 王跃智, 等. 温度对溪红点鲑耗氧率、排氨率和窒息点的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2010, 25(1): 93-96.
- Xu S G, Yang G Q, Wang Y Z, *et al.* Effects of water temperature on oxygen consumption, ammonia excretion and suffocation point in brook trout *Salvelinus fontinalis*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2010, 25(1): 93-96(in Chinese).
- [9] 齐志宏. 美洲红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)的养殖及繁殖技术研究[J]. *现代渔业信息*, 2010, 25(6): 24-26.
- Qi Z H. A study on culture and breeding technique of *Salvelinus fontinalis*[J]. *Modern Fisheries Information*, 2010, 25(6): 24-26(in Chinese).
- [10] 虎永彪, 张艳萍, 娄忠玉, 等. 美洲红点鲑染色体核型分析[J]. *水产科技情报*, 2010, 37(3): 154-156.
- Hu Y B, Zhang Y P, Lou Z Y, *et al.* Study on the karyotype of *Salvelinus fontinalis*[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2010, 37(3): 154-156(in Chinese).
- [11] 李永发, 刘奕, 夏资博, 等. 美洲红点鲑血液生理生化指标和流变学性质的研究[J]. *水产学杂志*, 2011, 24(1): 46-49.
- Li Y F, Liu Y, Xia Z B, *et al.* Study on the blood physiobiochemistry and hemorheology of *Salvelinus fontinalis*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(1): 46-49(in Chinese).
- [12] 杨建宝, 张艳萍, 苏军虎, 等. 引进美洲红点鲑群体遗传多样性微卫星的分析[J]. *四川动物*, 2012, 31(3): 348-352.
- Yang J B, Zhang Y P, Su J H, *et al.* Genetic analysis of cultured *Salvelinus fontinalis* in China inferred from microsatellites[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2012, 31(3): 348-352(in Chinese).
- [13] 谷伟, 郭媛, 户国, 等. 美洲红点鲑、白斑红点鲑及杂交后代遗传分析[J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47(7): 48-55.
- Gu W, Guo Y, Hu G, *et al.* Genetic diversity of *Salvelinus fontinalis*, *S. leucomaenis* and their hybrid offsprings[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(7): 48-55(in Chinese).
- [14] King T L, Lubinski B A, Burnham-Curtis M K, *et al.* Tools for the management and conservation of genetic diversity in brook trout (*Salvelinus fontinalis*): tri- and tetranucleotide microsatellite markers for the assessment of genetic diversity, phylogeography, and historical demographics[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2012, 4(3): 539-543.
- [15] 李超, 鲁翠云, 郑先虎, 等. 一种保存鱼类鳍条的便捷方法[J]. *水产学杂志*, 2014, 27(1): 22-24.
- Li C, Lu C Y, Zheng X H, *et al.* A simple and efficient method for preserving fish fins[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2014, 27(1): 22-24(in Chinese).
- [16] Pasquier J, Cabau C, Nguyen T, *et al.* Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 368.
- [17] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [18] Do C, Waples R S, Peel D, *et al.* NeEstimator V2: Reimplementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(1): 209-214.
- [19] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2007, 1: 47-50.
- [20] Lindqvist A K, Magnusson P K, Balciuniene J, *et al.* Chromosome-specific panels of tri- and tetranucleotide microsatellite markers for multiplex fluorescent detection and automated genotyping: evaluation of their utility in pathology and forensics[J]. *Genome Research*, 1996, 6(12): 1170-1176.
- [21] 鲁翠云, 毛瑞鑫, 李鸥, 等. 鲤鱼三、四核苷酸重复微卫星座位的筛选及特征分析[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(6): 979-987.

- Lu C Y, Mao R X, Li O, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic tri- and tetranucleotide repeat microsatellite loci in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17(6): 979-987(in Chinese).
- [22] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. *Genome Research*, 2000, 10(7): 967-981.
- [23] 石耀华, 洪葵, 郭希明, 等. 马氏珠母贝EST微卫星的筛选[J]. *水产学报*, 2008, 32(2): 174-181.
- Shi Y H, Hong K, Guo X M, *et al.* Microsatellite markers screening from EST sequences of *Pinctada martensii* Dunker[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 174-181(in Chinese).
- [24] 鲁翠云. 鲤生长性状主效 QTL 育种潜力评估及其在染色体上的定位 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Lu C Y. Breeding potentials and chromosome locations of the major QTLs affecting growth traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014(in Chinese).
- [25] Clemento A J, Anderson E C, Boughton D, *et al.* Population genetic structure and ancestry of *Oncorhynchus mykiss* populations above and below dams in south-central California[J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10(5): 1321-1336.
- [26] Grandjean F, Verne S, Cherbonnel C, *et al.* Fine-scale genetic structure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers: effects of restocking and natural recolonization[J]. *Freshwater Biology*, 2009, 54(2): 417-433.

Screening of microsatellite markers based on transcriptome and population genetic structure analysis of introduced *Salvelinus fontinalis*

ZHENG Xianhu, LU Cuiyun, SUN Zhipeng, DANG Hongyang, KUANG Youyi,
CAO Dingchen, BAI Qingli, SUN Xiaowen*

(National and Local Joint Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding,

Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) belongs to Salmoniformes and Salmonidae. It is native to northeastern North America with fast growth rate and high feed efficiency. Since it was introduced into China, it has become an important cultured species in cold water. In order to study the population genetic structure and germplasm resource status of the introduced *S. fontinalis* population, 1 081 pairs of tetranucleotide repetitive microsatellite primers were designed by screening the transcriptome data of *S. fontinalis*. A total of 200 pairs were selected for primer synthesis, and 111 microsatellite markers with good specificity and high amplification efficiency were obtained through PCR amplification. Twenty-seven pairs of microsatellite primers were selected and used to analyze the polymorphism and genetic diversity of the introduced and cultured populations of *S. fontinalis*. The results are shown as follows: a total of 171 alleles were detected in 27 microsatellite markers in two populations. The polymorphism information content (*PIC*) ranged from 0.426 0 to 0.877 4, with an average of 0.673 1, of which 23 loci were highly polymorphic ($PIC \geq 0.5$). The average number of alleles (N_a) was 5.555 6 and 4.444 4; the average number of effective alleles (N_e) was 3.914 5 and 3.108 2; the average observed heterozygosity (H_o) was 0.356 2 and 0.265 0; the average expected heterozygosity (H_e) was 0.700 2 and 0.621 0; and the average *PIC* was 0.640 9 and 0.555 5; respectively. The genetic parameters of the introduced population were tested by paired sample t test. The results showed that the five genetic diversity parameters of the cultured population were significantly or extremely significantly lower than those of the introduced population, indicating that although the *PIC* of the cultured population was still at a high polymorphic level ($PIC \geq 0.5$), serious allele enrichment had occurred after multiple generations of self-breeding. Using a test of the Hardy-Weinberg principle (χ^2 test) and Bonferroni calibration, all except 8 and 4 loci had deviated equilibrium in the introduced and cultured populations respectively, and most loci displayed heterozygote deficiency. There was high genetic differentiation ($F_{st}=0.164 2$), genetic similarity coefficient was 0.582 2 and genetic distance was 0.540 9 between the two populations, which indicated that there was significant genetic differentiation between introduced and cultured populations. These polymorphic markers may also be useful in future studies of population genetics, linkage mapping and assisted breeding in *S. fontinalis*.

Key words: *Salvelinus fontinalis*; transcriptome; microsatellite marker; introduced population; genetic structure

Corresponding author: SUN Xiaowen. E-mail: sunxw2002@163.com

Funding projects: Ministry of Agriculture and Rural Affairs “948” Project (2016-X15); National Aquatic Germplasm Resource Platform (2019DKA30470)