

漠斑牙鲆微卫星标记筛选及美国群体遗传结构分析

刘智超^{1,2} 廖梅杰^{2*} 徐永江² 柳学周² 王印庚² 张正² 刘洋²

(¹中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(²青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

摘要 采用磁珠富集法筛选适合漠斑牙鲆遗传多样性分析的微卫星分子标记。筛选共获得43条序列, 其中完美型26个, 占60.5%; 非完美型14个, 占32.6%; 复合型3个, 占6.9%。选取其中14对特异性好且扩增效率高的微卫星引物, 对采自美国北卡罗来纳州沿海的漠斑牙鲆野生群体和养殖群体进行遗传多样性及遗传结构比较分析。研究表明, 12对引物的扩增产物具有多态性, 其中7个位点为高度多态($PIC > 0.5$)。两个群体中共检测到90个等位基因。12个多态性微卫星位点在两个群体中的平均观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为0.36和0.57。9个位点在整个群体中呈现出不同程度的偏离遗传平衡($P < 0.05$), 且偏离平衡的位点均表现为杂合子缺失($F_{is} > 0$)。野生群体和养殖群体间的遗传距离为0.1115, 群体间的遗传分化微弱($F_{st} = 0.0438$)。

关键词 漠斑牙鲆 微卫星标记 筛选 野生和养殖群体 遗传结构

中图分类号 Q347 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)01-0040-07

Isolation of microsatellite DNA markers from southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, and its application in genetic structure analysis

LIU Zhi-chao^{1,2} LIAO Mei-jie^{2*} XU Yong-jiang² LIU Xue-zhou²

WANG Yin-geng² ZHANG Zheng² LIU Yang²

(¹College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

ABSTRACT A repeat-enriched genomic library was constructed from southern flounder *Paralichthys lethostigma* in order to evaluate the level of genetic diversity and population structure. In the first batch, 45 positive clones were successfully sequenced and 43 sequences were found to contain repeat motifs. According to Weber(1990) classification rules, the sequences were divided into three categories: 26 perfect repeat sequences without interruptions in the runs of CA or GA dinucleotides (60.5%), 14 imperfect repeat sequences with one or more interruptions in the run of repeats (32.6%), and 3 compound repeat sequences with adjacent tandem simple repeats of a different sequence (6.9%). Fourteen pairs of microsatellite primers were selected and used to analyze the polymorphism and genetic structure of the wild and cultured population of southern flounder from America. The results were shown as follows: two loci were monomorphic, and 12 loci were polymorphic, in

国家科技支撑课题(2012BAD17B03)、国家鲆鲽类产业技术体系和公益性行业(农业)科研专项经费(nyhyzx07-046-鲆鲽)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85841732

收稿日期: 2011-05-27; 接受日期: 2011-09-16

作者简介: 刘智超(1987-), 女, 硕士, 主要从事水产养殖疾病控制及微生物方向的研究。E-mail: nolan.11@163.com

which 7 loci showed high polymorphic levels judged by PIC value ($PIC > 0.5$). The averages of observed and expected heterozygosities of the 12 polymorphic loci were 0.36 and 0.57, respectively. In addition, a total of 90 alleles (50 effective alleles) were detected at 12 loci in total samples. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) analysis showed that 9 loci deviated from genetic equilibrium to different extent in the two populations and heterozygote deficiency occurred in total samples ($F_{is} > 0$). The level of genetic diversity in the wild population was significantly higher than that of the cultured population, and the genetic distance between two populations was 0.111 5, which indicated that the genetic differentiation between two populations was quiet weak. Twelve polymorphic microsatellites were identified in this study, and these microsatellite loci would be useful to analyze genetic diversity, and protect germ plasm resource of southern flounder.

KEY WORDS *Paralichthys lethostigma* Microsatellite DNA loci Isolation
Wild and cultured population Genetic structure

漠斑牙鲆 *Paralichthys lethostigma*, 又名南方鲆 (Southern flounder), 隶属硬骨鱼纲、鲽形目、鲽亚目、鲆科、牙鲆亚科、牙鲆属, 属深海底栖鱼类, 原产于美国沿海。具有生长快、肉质细腻、营养丰富、食性杂、饲料系数低、适应性广、耐高温、耐低氧、抗逆性强和易运输等优点, 在海水及淡水中都能生长, 具有很高的经济价值 (王兴强等 2006; 白国福等 2006)。在美国等国家深受消费者喜爱, 也是公认的优质养殖鱼, 这一养殖产业在美国发展迅速 (李 树 2005)。自从漠斑牙鲆引入我国后, 在我国陆续开展池塘养殖、网箱养殖和工厂化养殖, 已成为继大菱鲆之后我国引进的又一养殖优良品种, 具有广阔的养殖前景。

目前, 针对漠斑牙鲆的研究, 主要集中在繁育生物学及养殖学方面 (林越超等 2008; 柳学周等 2007; 蔡文超等 2007; 杨瑜瑜 2010), 而对其遗传结构分析方面报道还有待完善。Bandon 等 (2001) 利用同工酶方法对美国漠斑牙鲆野生群体进行了群体多态性分析, 李鹏飞等 (2006) 采用同工酶方法对漠斑牙鲆引进种群进行遗传多态性分析研究, 尤 锋等 (2006a) 还利用 RAPD 方法分别分析了漠斑牙鲆引进群体子一代以及漠斑牙鲆养殖群体遗传多样性; 尤 锋等 (2006b) 采用牙鲆微卫星引物进行跨物种扩增, 筛选出 10 对适合漠斑牙鲆群体的微卫星引物, 并对养殖群体遗传多态性进行分析; Shao 等 (2008) 筛选出漠斑牙鲆的 10 个多态性位点。总体上讲, 目前现有的漠斑牙鲆微卫星引物数量不足, 尚不能满足开展漠斑牙鲆相关微卫星标记的遗传学研究的需要, 目前采用微卫星标记对其遗传结构的研究鲜有报道。本研究采用磁珠富集法从漠斑牙鲆基因组中筛选微卫星分子标记, 并利用这些标记对美国漠斑牙鲆野生和养殖群体进行遗传多样性和遗传结构分析, 以为漠斑牙鲆的种质资源保护及遗传育种工作的开展提供依据, 并为漠斑牙鲆在我国可持续养殖提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用漠斑牙鲆野生群体 30 尾 (全长 38~46 cm, 体重 470~2 083 g), 于 2010 年 8 月采自北卡罗来纳州 Wilmington 沿海大西洋海域, 漠斑牙鲆养殖群体 30 尾 (6 月龄, 体长 10~16 cm, 体重 19~35 g) 采自北卡罗来纳大学 Wilmington 分校海洋科学中心, 其亲体是 2008 年捕获的 Wilmington 沿岸大西洋漠斑牙鲆野生亲体群体经驯化后的个体, 2009 年在人工调控下野生亲鱼自然产卵, 经人工育苗获得养殖群体。所有实验鱼, 剪胸鳍保存于无水乙醇, 用于基因组 DNA 提取。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

使用 TIANGEN 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取漠斑牙鲆的基因组 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶

电泳检测基因组 DNA 完整性,紫外分光光度计定量, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 微卫星 DNA 标记筛选

基因组 DNA 经内切酶 *Mse* I 消化后分离纯化、与接头序列相连,扩增得到 DNA 文库。采用磁珠富集法分两组分别与生物素标记的 $\text{Bio}-(\text{CA})_{12}$ 和 $\text{Bio}-(\text{GA})_{12}$ 探针杂交,再通过包被在磁珠上的链亲和素与生物素结合。经处理洗脱后,获得单链目的 DNA 片段,经过扩增后获得含微卫星 DNA 的双链 DNA 片段。将目的片段与 pMD18-T 克隆载体相连,转入 *Trans* 1-T1 感受态细胞,构建富含 $(\text{CA})_n$ 及 $(\text{GA})_n$ 的漠斑牙鲆微卫星 DNA 富集文库。

从 $(\text{CA})_n$ 及 $(\text{GA})_n$ 文库中各随机挑选 100 个单克隆,检测阳性克隆率,同时用探针对应的引物检测微卫星 DNA 序列是否位于插入序列的中间位置,以便设计引物(Liao *et al.* 2007)。将符合要求的阳性克隆送去测序。用 Chromas V2.22 软件分析测序结果,去掉接头序列和载体序列。用 SSRHunter 软件(<http://en.bio-soft.net/dna/SSRHunter.html>)查找微卫星位点,根据 Weber 等(1990)提出的标准将微卫星核心重复序列进行分型。用 Primer Premier 5.0 软件设计相应的 PCR 扩增引物。

1.2.3 引物筛选及多态性检测

对设计好的引物进行梯度退火温度筛选,摸索出最佳退火温度,同时筛选出特异性好、扩增效率高的引物。以所筛选的特异性高的微卫星引物对所采集的美国漠斑牙鲆野生和养殖群体进行多态性检测。PCR 扩增体系为: $10\times$ Buffer $2.5\ \mu\text{l}$, $2.5\ \text{mmol/L}$ dNTP $2\ \mu\text{l}$, $10\ \mu\text{mol/L}$ 引物各 $0.5\ \mu\text{l}$, $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 模板 $2\ \mu\text{l}$, TaKaRa *Taq* ($5\text{U}/\mu\text{l}$) $0.2\ \mu\text{l}$ 加水到 $25\ \mu\text{l}$ 。PCR 反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 复性温度(表 1)复性 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物通过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,根据迁移速度对条带依次编号,迁移最快的条带记为 A, 依次类推。

1.2.4 野生和养殖漠斑牙鲆群体的遗传多样性及遗传结构分析

利用 Popgene32 软件(<http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>)计算各微卫星位点在两个群体及总群体的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e),计算观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、计算 Nei's 指数、Shannon's 指数和 F-统计量。用 χ^2 检验估计群体 Hardy-Weinberg 平衡偏离。用连锁不平衡检验软件进行微卫星位点间连锁不平衡分析。利用 Botstein 等(1980)提供的方法,计算各位点的多态信息含量(PIC)。另外,遗传多样性(H_t)可分为群体内遗传多样性(H_{wp})和群体间遗传多样性(H_{bp})两部分(Lewontin *et al.* 1972),群体间的遗传分化(GD)计算公式为 $H_{bp}/H_t\times 100\%$ 。Popgene 软件还可计算各个位点的固定指数(Fit 、 Fis 、 Fst)及 Nei's 标准遗传距离(D_s)等指标来检测群体的遗传分化程度。

2 结果

2.1 漠斑牙鲆微卫星序列特征

从构建的漠斑牙鲆 $(\text{CA})_n$ 及 $(\text{GA})_n$ 微卫星富集文库中,各随机挑选 100 个克隆,经重组子检测筛选 $(\text{CA})_n$ 位于插入序列的中间位置的阳性克隆有 48 个,阳性克隆率为 48%。同样的条件, $(\text{GA})_n$ 得到了 38 个阳性克隆,阳性克隆率为 38%。从两个文库中随机选取的 45 个阳性克隆进行测序,共获得 43 条(95.5%)含有微卫星的克隆序列,经软件 DAMBE 比对后无重复序列。通过 SSRHunter 软件查找微卫星位点并进行分析,根据 Weber 提出的标准,获得完美型序列 26 条(60.5%)、非完美型序列 14 条(32.6%)、复合型序列 3 条(6.9%)。

2.2 引物设计及扩增条件摸索

根据测定的序列信息,除侧翼序列太短无法设计引物外,用 Primer Premier 5.0 软件设计了 31 对引物。对这些引物进行梯度退火温度筛选,获得最适退火温度,选取其中 14 对扩增效率高、特异性好的引物用于后续的多态性分析,这些微卫星 DNA 标记的名称、引物相关信息等见表 1。

2.3 微卫星位点多态性及遗传结构分析

用筛选获得的 14 对引物对采自美国北卡罗来纳州的野生群体和养殖群体各 30 个样本进行多态性检测,

表 1 漠斑牙鲆微卫星 DNA 标记的核心序列、引物序列和扩增的复性温度

Table 1 Motif, primer sequences and primer annealing temperature for microsatellite DNA markers of *P. lethostigma* developed in this study

位点 Locus	序列获取号 Accession No.	重复单元 Repeat motif	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度 T _m (°C)	预计扩增片段长度 Expected size(bp)
BCA27	JF502035	(AC) ₂₃	F: ACAGTGAGCAGGAAGCCATTAT R: CTGGGTGTAAACCTGAGGAGTG	57	279
BCA50	JF502039	(CA) ₁₂	F: CAGATACAGTCCCTCAGCGTTAC R: GACTGCCGCCATTTAGCC	54	88
BCA52	JF502040	(AC) ₂₂	F: ACGATGACTGGGCTGTGAG R: TGGATGGGTAATGGGATAG	57	182
BCA65	JF502041	(AC) ₄ AA(AC) ₄	F: GCTTGTTATCCCTCTTTCTGT R: GAGTGGTGCTCATGTTGTTT	54	146
BCA68	JF502042	(CA) ₇	F: GCATAGAAGACGGCGCAGAC R: CAGCGTTATTGCCTCTTGTC	57	118
BCA70	JF502044	(AC) ₁₄	F: TTCCAAAACCAATGATGC R: AGAAAAAAGGAAAAATATGTGGTC	54	366
BCA83	JF502045	(AC) ₅	F: CATATTTACGACTTTTCCTGCC R: CCATCCCACCCTCCTTGACT	57	153
BCA84	JF502046	(AC) ₇	F: ACCACTGAGCCACAACCACCA R: GGCTTTGTCCGCCACATCCT	57	112
GA5	JF502048	(GA) ₆	F: GAATCCGATATGTTTTATGACCT R: GCAAAGTTTAGGAACCACCA	54	220
GA12	JF502050	(AG) ₉ AA(AT) ₆	F: CCCGTACTCCATCCAATCA R: TGTCTACTTTTCAGCAATCCA	57	188
GA13	JF502051	(GA) ₇	F: CCCTGGCGATGAGGAAAT R: GCCGTGCTGAATAATAGATGC	54	90
GA31	JF502053	(AG) ₅ GC(AG) ₄	F: GCAACAACATCAAAGACCCAGA R: TTCCTAAACCGATTCCCTCCA	57	180
GA34	JF502054	(GA) ₉ (AG) ₅	F: ATTGTGAAAGGGATCAAGGGTG R: GTGTTTCCTTCTGTATTGTTCCCA	54	133
GA94	JF502058	(CA) ₁₇	F: TACAACCAACCCCTCCATTATTT R: GCTGGTCTCACATCGTTCACTG	54	141

结果如表 2 所示。除 BCA50 及 GA12 位点是单态位点外,其余 12 对引物全部扩增稳定并具有多态性,BCA65、GA13 为低度多态位点($PIC < 0.25$),BCA68、GA5 和 GA31 为中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$),其余 7 个位点均为高度多态位点($PIC > 0.5$)。

从两个群体总体来看,12 对多态性引物在两个群体中共检测出 90 个等位基因(N_a),范围为 2(GA13)~16(BCA27)个。野生群体平均等位基因为 7.3 个,平均有效等位基因为 4.3 个;养殖群体的平均等位基因为 4.8 个,平均有效等位基因为 2.9 个。12 个微卫星位点在漠斑牙鲆两个群体的观察杂合度(H_o)为 0(GA13)~0.65(BCA70),平均 0.36;期望杂合度(H_e)为 0.07(GA13)~0.90(BCA27、BCA52),平均 0.57;野生群体和养殖群体的平均期望杂合度分别为 0.58 和 0.52。由数据分析可知,野生群体等位基因数、有效等位基因数及杂合度均高于养殖群体,野生群体多态性高于养殖群体。

对 12 个微卫星位点的哈德-温伯格平衡(HWE)分析发现,在漠斑牙鲆的野生群体中,BCA27、BCA65、BCA68、BCA83、GA31、GA94 位点符合哈德-温伯格平衡(HWE)($P > 0.05$);在养殖群体中,BCA65、BCA68、BCA70、GA5、GA31、GA34 位点符合哈德-温伯格平衡(HWE)($P > 0.05$);从两个群体看,除 BCA27、BCA65、BCA68 符合 HWE 外,其他 9 个位点均偏离 HWE($P < 0.05$),连锁不平衡检测结果表明 12 个多态性位点之间

不存在连锁不平衡现象。

表2 野生群体及养殖群体在12个微卫星位点的多样性指数

Table 2 The genetic diversity indices of 12 microsatellite DNA markers for the two populations

基因座 Locus	野生群体 Wild population						养殖群体 Cultured population						总群体 All					
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	<i>P</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	<i>P</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	<i>P</i>
BCA27	16	9.0	0.67	0.90	0.88	0.922	7	4.9	0.78	0.81	0.77	0.037	16	9.1	0.72	0.90	0.88	0.147
BCA52	12	8.9	0.41	0.90	0.88	0.013	8	5.1	0.44	0.82	0.78	0.015	13	9.0	0.42	0.90	0.88	0.000
BCA65	2	1.1	0.10	0.10	0.09	0.746	2	1.0	0.03	0.03	0.03	1.000	3	1.1	0.07	0.07	0.06	0.991
BCA68	6	2.1	0.47	0.53	0.49	0.363	4	1.5	0.37	0.33	0.30	0.894	6	1.8	0.42	0.44	0.42	0.714
BCA70	9	7.3	0.60	0.88	0.85	0.003	5	3.6	0.70	0.74	0.67	0.243	9	5.4	0.65	0.82	0.79	0.000
BCA83	3	2.1	0.47	0.54	0.47	0.105	3	2.8	0.37	0.66	0.57	0.008	3	2.5	0.42	0.61	0.53	0.007
BCA84	6	2.3	0.28	0.57	0.53	0.011	4	3.3	0.50	0.71	0.64	0.000	6	3.3	0.39	0.71	0.65	0.000
GA5	4	1.4	0.13	0.27	0.25	0.002	2	1.4	0.23	0.30	0.25	0.218	4	1.4	0.18	0.29	0.27	0.000
GA13	2	1.1	0.00	0.13	0.12	0.000	1	1.0	0.00	0.00	—	—	2	1.1	0.00	0.07	0.06	0.000
GA31	3	1.6	0.23	0.39	0.32	0.113	3	1.4	0.23	0.27	0.25	0.094	3	1.5	0.23	0.33	0.29	0.047
GA34	10	4.8	0.32	0.80	0.76	0.017	11	4.4	0.53	0.79	0.75	0.302	11	5.2	0.43	0.82	0.79	0.000
GA94	14	10.3	0.53	0.92	0.90	0.463	8	4.4	0.33	0.78	0.74	0.000	14	8.7	0.43	0.89	0.87	0.000
平均值 Average	7.3	4.3	0.35	0.58	0.54	—	4.8	2.9	0.38	0.52	0.52	—	7.5	4.2	0.36	0.57	0.54	—

注:*Na*:等位基因数,*Ne*:有效等位基因数,*Ho*:观测杂合度,*He*:期望杂合度,*PIC*:多态信息含量,*P*:哈德-温伯格平衡检验

Note: *Na*: Allele number, *Ne*: Effective allele number, *Ho*: Observed Heterozygosity, *He*: Expected Heterozygosity,

PIC: Polymorphism index content, *P*: *P* value for Hardy-Weinberg test

2.4 群体间遗传关系

对群体间和群体内的遗传多样分析结果见表3。由表3可知,漠斑牙鲆群体内的总遗传多样性指数为

表3 漠斑牙鲆野生群体和养殖群体的遗传多样性和遗传分化

Table 3 Genetic diversities and genetic differentiation of the wild and cultured populations

基因座 Locus	Shannon's 信息指数 Shannon's information index						Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity					
	野生群体 Wild population	养殖群体 Cultured population	总样本 Total	<i>Hwp</i>	<i>Hbp</i>	GD (%)	野生群体 Wild population	养殖群体 Cultured population	总样本 Total	<i>Hwp</i>	<i>Hbp</i>	GD (%)
BCA27	2.46	1.76	2.43	2.13	0.30	12.39	0.89	0.80	0.89	0.84	0.05	5.09
BCA52	2.31	1.79	2.34	2.06	0.27	11.69	0.89	0.81	0.89	0.85	0.04	4.54
BCA65	0.20	0.08	0.16	0.14	0.02	14.10	0.10	0.03	0.06	0.06	0.00	1.54
BCA68	1.09	0.67	0.96	0.88	0.08	8.76	0.52	0.32	0.43	0.42	0.01	3.22
BCA70	2.08	1.39	1.87	1.73	0.14	7.30	0.86	0.72	0.82	0.79	0.02	2.70
BCA83	0.91	1.07	1.01	0.99	0.02	1.70	0.53	0.65	0.60	0.59	0.01	2.11
BCA84	1.19	1.26	1.36	1.22	0.14	10.08	0.56	0.70	0.70	0.63	0.07	9.99
GA5	0.56	0.48	0.57	0.52	0.06	9.58	0.27	0.30	0.29	0.28	0.01	2.24
GA13	0.24	0.00	0.15	0.12	0.02	16.19	0.12	0.00	0.06	0.06	0.00	3.42
GA31	0.62	0.52	0.59	0.57	0.02	3.32	0.38	0.27	0.33	0.32	0.01	2.17
GA34	1.79	1.87	1.94	1.83	0.11	5.57	0.79	0.77	0.81	0.78	0.03	3.41
GA94	2.46	1.70	2.34	2.08	0.26	11.00	0.90	0.77	0.89	0.84	0.05	5.37
平均值 Average	1.33	1.05	1.31	1.19	0.12	9.33	0.57	0.51	0.56	0.54	0.03	4.44

注:*Hwp*:群体内遗传多样性,*Hbp*:群体间遗传多样性,*GD*:群体间遗传分化

Note: *Hwp*: genetic diversity within populations; *Hbp*: genetic diversity between populations; *GD*: genetic differentiation

1.31, 其中群体内的遗传多样性指数为 1.19, 群体间遗传多样性指数为 0.12, 野生群体和养殖群体间的遗传分化平均为 9.33%; 在 Nei's 基因多样性上, 漠斑牙鲆群体的总基因多样性指数为 0.56, 漠斑牙鲆群体内的基因多样性指数是 0.54, 而群体间遗传多样性指数是 0.03, 野生群体和养殖群体间的遗传分化平均为 4.44%。

F-统计量是检验群体的遗传分化的重要指标, 包含 3 个参数: 总近交系数 (*Fit*)、群体内近交系数 (*Fis*)、群体间分化系数 (*Fst*)。漠斑牙鲆野生和养殖群体 12 个多态性座位的 F-统计量分析结果见表 4。基于 12 个微卫星计算的群体间遗传分化系数 *Fst* 为 0.043 8 ($Fst < 0.05$), 野生群体和养殖群体分化较弱; 群体内的近交系数 *Fis* 为 0.355 5, 群体内杂合子缺失显著。漠斑牙鲆两个群体间的遗传相似度为 0.894 5 (表 5), 遗传距离 (*Ds*) 为 0.111 5, 两个群体间分化较弱。

表 4 漠斑牙鲆野生和养殖群体在 12 个微卫星位点的 F 统计量

Table 4 Effective number of Fixation index (F) of 12 microsatellite DNA markers in the two populations

基因座 Locus	总近交 系数 <i>Fit</i>	群体内近 交系数 <i>Fis</i>	群体分化 系数 <i>Fst</i>	基因座 Locus	总近交 系数 <i>Fit</i>	群体内近 交系数 <i>Fis</i>	群体分化 系数 <i>Fst</i>
BCA27	0.142 2	0.186 1	0.051 1	GA5	0.353 6	0.368 1	0.022 5
BCA52	0.499 5	0.522 3	0.045 6	GA13	1.000 0	1.000 0	0.034 5
BCA65	-0.043 5	-0.027 8	0.015 0	GA31	0.279 6	0.295 3	0.021 8
BCA68	0.008 6	0.040 6	0.032 3	GA34	0.452 9	0.471 5	0.034 1
BCA70	0.180 7	0.202 9	0.027 1	GA94	0.482 6	0.510 4	0.053 7
BCA83	0.291 5	0.306 4	0.021 0				
BCA84	0.382 6	0.444 4	0.100 1	Mean	0.326	0.355 5	0.043 8

表 5 漠斑牙鲆野生群体、养殖群体的遗传距离和相似性指数

Table 5 Genetic identity and genetic distance in wild and cultured populations

群体 Population	野生群体 Wild	养殖群体 Cultured
野生群体 Wild	—	0.894 5
养殖群体 Cultured	0.111 5	—

注: 对角线以下数据为遗传距离, 对角线以上数据为相似性指数

Notes: Data below diagonal are genetic distance; Data above diagonal are genetic identity

3 讨论

漠斑牙鲆于 21 世纪初从美国引种到国内后, 其养殖规模逐步扩大, 经过近 10 年的养殖, 已经形成以工厂化养殖和池塘养殖为主的养殖模式, 养殖前景十分广阔。然而, 目前有关人工养殖对其种质结构影响的评价研究相对较少。为

探讨养殖过程对其种质结构的影响, 本研究从漠斑牙鲆基因组 DNA 筛选微卫星位点, 并利用所开发的微卫星标记对采自美国的漠斑牙鲆野生群体和养殖群体遗传多态性加以分析, 以期为我国漠斑牙鲆的养殖业健康和可持续发展提供借鉴。

Blandon 等(2001)利用同工酶方法对美国几个海区的漠斑牙鲆野生群体进行了遗传多态分析, 检测到其群体的多态座位范围为 4.41%~10.29% ($P_{0.99}$), 平均为 7.5%; 平均杂合度范围为 0.03~0.12。李鹏飞等(2006)同样利用同工酶的方法对漠斑牙鲆引进种群进行遗传多态性分析, 发现在 15 种同工酶共记录的 33 个位点中, 有 11 个座位呈多态, 预期杂合度为 0.121。

尤 锋等(2006a)利用牙鲆微卫星引物, 对漠斑牙鲆养殖群体遗传多态性进行分析, 检测到漠斑牙鲆养殖群体等位基因数为 2~6 个, 观察杂合度值为 0.291 7~0.958 3, 期望杂合度值为 0.405 3~0.755 3; 多态信息含量 *PIC* 为 0.353~0.746, 其中 6 个为高度多态位点, 另外 4 个为中度多态位点。Shao 等(2008)开发了 10 对漠斑牙鲆多态性位点并对其遗传结构作出分析。结果表明, 等位基因数范围是 2~9, 观测杂合度范围是 0.250~0.900, 期望杂合度范围是 0.446 9~0.851 4。本实验所得等位基因范围是 2~16, 观察杂合度为 0~0.65 (平均 0.36), 期望杂合度为 0.07~0.90 (平均 0.57), 结果与尤 锋等(2006a)、Shao 等(2008)结果基本吻合, 其数据的微小差异可能与选择的漠斑牙鲆群体差异有关, 也有可能是微卫星位点之间的差异。由此得出,

利用微卫星方法分析漠斑牙鲆的遗传结构,均高于上述同工酶结果,灵敏度较高的微卫星分析方法能更好地揭示其遗传信息。

维持种内遗传多样性,是抵御养殖风险的重要途径。 PIC 、 N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 、 $Nei's$ 指数、Shannon's 指数和 F-统计量等都是衡量群体遗传多样性的标准。本研究中有 7 个位点为高度多态位点($PIC > 0.5$),野生群体和养殖群体的 PIC 值分别为 0.54 和 0.52,且两个群体的平均期望杂合度分别为 0.58、0.52,漠斑牙鲆的野生群体和养殖群体的多态性均处于较高水平,野生群体多态性略高于养殖群体。野生群体和养殖群体平均 $Nei's$ 指数为 0.57、0.51,平均 Shannon's 指数为 1.33、1.05,说明漠斑牙鲆种群内的遗传多样性较高,野生群体和养殖群体间的遗传分化不大。由此可知,虽然美国漠斑牙鲆的野生群体和养殖群体分化微弱,但是明显看出养殖群体遗传多样性水平有所降低。

在未来繁育及养殖过程中,如果不注重加强亲本群体的多样性保护,随着育种效应的累加,会使子代遗传多样性进一步降低,加大养殖过程中的风险。因此,在育种过程中,保护野生资源的同时,还要注意保持选育亲本的数量和选育群体的遗传多样性,保障漠斑牙鲆养殖产业的健康、可持续发展。

本研究以采自美国的漠斑牙鲆野生及养殖群体为实验材料,开展了微卫星标记研制及规模化养殖对其遗传多样性影响的评估。相应研究结果,不仅为中国的漠斑牙鲆养殖业提供借鉴,而且所获得的高多态性微卫星位点,可为后续的漠斑牙鲆的种质资源保护和开发、遗传分析、图谱构建等工作提供基础数据。

参 考 文 献

- 王兴强, 阎斌伦, 曹梅, 马生, 董双林. 2006. 漠斑牙鲆生物学及其养殖研究进展. 海洋湖沼通报, (3): 128~134
- 尤锋, 吴志昊, 王伟, 徐冬冬, 许建和, 倪静, 孙威, 张培军, 徐永立, 杨学宋, 孙寿科. 2006a. 漠斑牙鲆养殖群体 RAPD 遗传多样性的初步分析. 海洋科学, 30(2): 86~90
- 尤锋, 王伟, 吴志昊, 徐冬冬, 许建和, 倪静, 孙威, 张培军, 徐永立, 杨学宋, 孙寿科. 2006b. 漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) 养殖群体微卫星座位遗传多态性的分析. 海洋科学进展, 24(2): 195~202
- 白国福, 林云. 2006. 漠斑牙鲆淡水养殖试验. 水产科学, 25(8): 420~421
- 李树. 2005. 漠斑牙鲆的生物学. 水利渔业, 25(3): 33
- 李鹏飞, 刘萍, 柳学周, 高天翔, 王清印. 2006. 漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析. 中国水产科学, 13(1): 13~19
- 李鹏飞, 刘萍, 柳学周. 2009. 漠斑牙鲆引进群体子一代遗传多样性的 RAPD 分析. 渔业科学进展, 30(1): 15~18
- 杨瑜瑜. 2010. 漠斑牙鲆苗种淡化及淡水池塘网箱养殖技术. 渔业致富指南, (22): 33~36
- 柳学周, 孙中之, 田景波, 梁友, 徐永江, 关健, 蔡文超. 2007. 漠斑牙鲆繁殖生物学及苗种繁育技术研究进展. 渔业现代化, (2): 14~17
- 林越超, 黄瑞芳, 张雅芝, 秦志清, 何伟湃, 林清海, 林玉群. 2008. 漠斑牙鲆人工育苗技术探讨. 福建水产, (2): 1~4
- 蔡文超, 区又君, 李加儿. 2007. 我国漠斑牙鲆养殖研究现状及展望. 南方水产, 3(6): 75~80
- Blandon, I. R., Ward, R., King, T. L., Karel, W. J., and Monaghan Jr., J. P. 2001. Preliminary genetic population structure of southern founder, *Paralichthys lethostigma*, along the Atlantic Coast and Gulf of Mexico. Fishery Bulletin, 99(4): 671~678
- Bostein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetic, 32(3): 314~331
- Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. Evolutionary Biology, 6: 381~398
- Liao, M. J., Yang, G. P., Wang, X. C., Wang, D. Q., Zou, G. W., and Wei, Q. W. 2007. Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Molecular Ecology Notes, 7(1): 95~99
- Shao, C. W., Liao, X., and Chen, S. L. 2008. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. Molecular Ecology Resources, 8(2): 381~383
- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA):(dG-dT)n polymorphisms. Genomics, 7(4): 524~530