

# 利用微卫星标记分析3个暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*)养殖群体的遗传多样性\*

邹杰<sup>1,2</sup> 马爱军<sup>1①</sup> 赵艳飞<sup>1</sup> 何伟国<sup>1</sup> 王婷<sup>1</sup>  
岳亮<sup>1</sup> 刘大勇<sup>3</sup> 郭正龙<sup>3</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 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 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 江苏中洋集团股份有限公司 南通 226600)

**摘要** 针对3个暗纹东方鲀养殖群体,采用21对微卫星引物对其遗传多样性进行分析,成功扩增出具有一定多态性片段的微卫星位点共19个。共得到125个等位基因,每位点等位基因数为3-11,平均值为6.58,有效等位基因数为1.7-7.8,平均值为4.5,平均观测杂合度为0.156-1.000,平均期望杂合度为0.399-0.876,平均多态信息含量(PIC)为0.353-0.858。广州、上海、江苏3个群体的PIC由小到大依次为0.588、0.633、0.655,三群体间遗传分化指数分别为0.048、0.062、0.076,平均值为0.081,表明三群体间发生了小程度的遗传分化。三群体间的遗传距离和UPGAM分析显示,广州和上海群体的遗传距离最远(0.351),广州和江苏群体的遗传距离最近(0.204),聚类分析显示,广州群体和江苏群体聚为一类,上海群体为一类。研究结果基本符合养殖群体的养殖环境,也表明3个养殖群体发生了一定程度的遗传分化,特别是江苏群体的遗传多样性较高,作为选育群体具有一定的遗传潜力。

**关键词** 暗纹东方鲀; 养殖群体; 微卫星; 遗传多样性

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0055-08

近年来,由于生态环境的恶化、长江水文条件的改变以及人为的捕捞强度增大等原因,暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)产量锐减(刘金海等,2014),资源枯竭现象日益严重。在2001年3月的长江旺汛期,捕获的野生暗纹东方鲀已不足100尾(吴建新等,2002)。野生暗纹东方鲀资源量的减少,加之养殖暗纹东方鲀亲本数量的限制,极可能导致养殖种群遗传多样性的下降,进而引起种质混杂及种质退化。微卫星(Microsatellite)是指以少数几个核苷酸(多数为2-4个)为单位多次串联重复的DNA序列(杜长斌等,2000;陆丽君等,2013)。目前缺乏关于微卫星标记对暗纹东方鲀进行遗传多样性分析的研究。

本研究选取暗纹东方鲀3个不同养殖群体作为研究对象,并运用21对微卫星标记对其遗传多样性进行分析,以期对暗纹东方鲀的苗种选育和遗传改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品选取

暗纹东方鲀样本于2012年由江苏中洋集团提供,3个群体分别为2010年4月繁育的广州养殖群体(GZ)、江苏养殖群体(JS)和上海养殖群体(SH)。每群体选取大小规格相同的样本各30尾,每尾剪其部分尾鳍鳍条,

\* 江苏省科技支撑计划(BE2013345)和江苏省水产三新工程项目(Y2013-12)共同资助。邹杰, E-mail: zoujie8697@163.com

① 通讯作者: 马爱军, 研究员, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-01-05, 收修改稿日期: 2014-06-20

置于-80℃冰箱中保存,并于2013年3月开始相关实验。

## 1.2 引物与试剂

引物序列参照 Ma 等(2009)暗纹东方鲀引物 10 对,古川聪史(2009)和郝君等(2006)红鳍东方鲀微卫

星引物 11 对。选取的微卫星引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、dNTP、胰 RNA 酶、蛋白酶 K、*Taq* 酶等购自青岛秀佰锐生物公司。21 对微卫星引物的序列、片段长度和退火温度见表 1。

表 1 21 对微卫星引物序列、片段长度及退火温度

Tab.1 Sequences and lengths of 21 microsatellite marker primers used in this study, and the specific annealing temperatures of PCR amplification

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'-3')	片段长度 Length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
Tob10	ACCCACTCCGTCCTTCCT TCAACCGCCCTTCCAAC	310-375	61
Tob11	GCCATATTGACCACTCACC ACCACAGAATGTCCTGCTT	176-285	57
Tob13	AGTAGAACGCTCGGTCAG GTTTGTAATCATCAAAAGG	309-334	59
Tob25	ACTCTTTCTCCAGCTCTC TGCTTCCTTTGATTTGTAT	244-266	55
Tob53	CCTACATCTCACCCAGTG AGGAAGCAAGACAAATAAG	232-260	55
Tob55	GCGCAGCTTGCACTGTAT TAGCCTCTTTAGTCTTGATGG	184-196	56
Tob61	AGAGGCTCCTGGGGAATT CAGCCCTGTCTCACACAT	123-190	58
Tob91	ATTACATCGACCAGAGCCT CACCTATACATCTTAGAATACCC	153-215	59
Tob107	GACCAGTCTCACTCCCTCC TGTGGTAACGGCCATTTCT	242-266	58
Tob108	TCCATTACCACAGAATGTCCTG GTGCCATATTGACCACTCACCTA	158-176	59
F0001	ACCCAATCTCACCTCCTG AACCCAAAGTTTGACCCT	217-238	58
F0003	CCTTGCCCTGTCCTTTAC AGCCACCTACATCCTTCAC	193-266	56
F0012	GAAGGGCTGGCAGAACAC CCCGCTTAGAATCCTGTT	123-180	58
F0013	CACTCGGCATAGCAGACC TATCAGGCACCGCAAGAA	290-306	56
F0020	ACAATGAGGCGTGGAAGT GTGAATGGATGTGGAGCA	147-162	56
fms32	ACACCGCTCAATGCAAATC AATGTGGCGGCTACTTTTCAG	178-202	61
fms57	CCAGCACAGGCACTTCAGAT ATTCTGAGCATCCGCATTGT	148-155	60
fms75	GGCTTTACCGAGGTGTTGAG TGGAATCTGTGCCCTCATCT	123-160	62
fms89	CGTCATGATCCAACACAAGA CGCACACATACAGAGTTCA	295-360	62
fms106	TCTACGGCGGACATCTCTTC CTCCGCGCTCTAAAAGTCAG	300-315	63
fms118	ACTGGACCCTGTGTTGCTCT CCTCAGTGGTGCCAGTGTA	345-370	62

### 1.3 基因组 DNA 的提取

取保存的暗纹东方鲀尾鳍每样本各 30 mg, 利用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行染色鉴定, 核酸蛋白测定仪检测 DNA 浓度, 稀释到 50 ng/ $\mu$ l,  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

### 1.4 PCR 反应及电泳

对每个群体的 30 个个体进行 PCR 扩增, 扩增总体系 15  $\mu$ l: *taq* 酶 0.2  $\mu$ l (5 U/ $\mu$ l)、dNTP 1.3  $\mu$ l ( $\mu$ mol/L)、Buffer 1.5  $\mu$ l、上下游引物各 0.6  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L)、模板 1  $\mu$ l (50 ng/ $\mu$ l)、补充水 10  $\mu$ l。反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 30 个循环( $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、退火 30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  复性 30 s),  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取扩增产物 5  $\mu$ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像分析仪上拍照检测。将 PCR 扩增产物变性, 在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 使用硝酸银染色, 并用扫描仪记录电泳图。

### 1.5 数据分析

利用 Popgene32 V1.32 软件计算各微卫星位点的等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、平均观察杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ ), 并计算 3 个群体的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ )、平衡检验概率值( $P$ )、遗传相似性系数( $I$ )和遗传距离( $D$ )。根据 Botstein 等(1980)的方法, 计算多态信息含量( $PIC$ )。用 SPSS 13.0 软件对各位点的期望杂合度( $H_e$ )进行 Kruskal-Wallis 检验, 并根据 Nei 氏标准遗传距离绘制聚类图。

## 2 结果

### 2.1 微卫星 PCR 扩增结果

将 21 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 经筛选得到 19 对引物能扩增出具有一定多态性的稳定产物。图 1 为暗纹东方鲀位点 *fms89* 在 GZ 群体、JS 群体、SH 群体的电泳图结果。

### 2.2 群体遗传多样性分析

对 3 个暗纹东方鲀群体进行遗传多样性分析, 表 2 列有筛选出的 19 个位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量等多样性参数。19 对微卫星引物得到的多样性结果: 等位基因数为 3–11, 平均值为 6.58; 有效等位基因数为 1.659–7.755, 平均值为 4.50; 观测杂合度( $H_o$ )为 0.156–1.000, 期望杂合度( $H_e$ )为 0.399–0.876; 多态信息含量( $PIC$ )为 0.353–0.858。其中, 除 F0020、*fms106*、*fms118*, 3 个位点多态性情况较为一般, 剩余位点的多态性都较高。此结果表明本研究的微卫星位点多样性较为丰富。

暗纹东方鲀 GZ、SH、JS 群体的观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量( $PIC$ )见表 3。可见 3 个群体的多样性较为丰富, 且 JS 群体多样性指数较其他二者的要高, GZ 群体最低。Kruskal-Wallis 检验显示,  $H$  值为 1.841,  $df$  值为 2,  $P$  值为 0.398, 差异不显著。

### 2.3 群体 Hardy-Weinberg 平衡分析

对 3 个群体的 19 个微卫星位点进行 Hardy-Weinberg

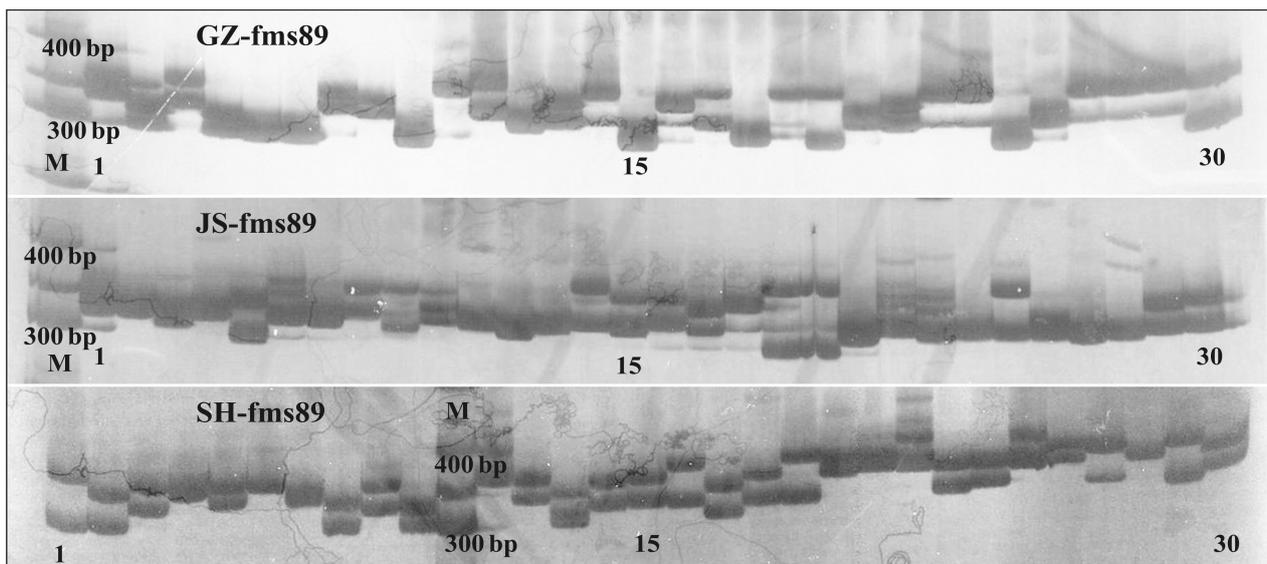


图 1 暗纹东方鲀位点 *fms89* 在 GZ 群体、JS 群体和 SH 群体的电泳  
Fig.1 Electrophoresis of microsatellite loci amplified with *fms89* in three cultured populations

1–30: DNA samples; M: DNA Marker

表2 19个微卫星位点的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量

Tab.2 The numbers of alleles ( $A$ ) and effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Polymorphism Information Content ( $PIC$ ) at the 19 microsatellite loci

位点 Locus	等位基 因数 $A$	有效等位 基因数 $N_e$	观测杂 合度 $H_o$	期望杂 合度 $H_e$	多态信息 含量 $PIC$
F0001	8	4.615	1.000	0.788	0.752
F0003	8	6.056	0.764	0.840	0.815
F0013	9	3.502	0.567	0.718	0.672
F0020	3	2.152	0.156	0.538	0.458
Tob10	7	4.862	0.622	0.799	0.764
Tob11	11	7.755	0.856	0.876	0.858
Tob25	4	2.443	0.411	0.594	0.507
Tob53	7	5.442	0.798	0.821	0.793
Tob55	4	2.560	0.433	0.613	0.550
Tob61	9	7.088	0.595	0.864	0.843
Tob91	5	4.430	0.633	0.779	0.739
Tob107	7	5.050	0.578	0.807	0.776
Tob108	9	6.007	0.822	0.838	0.813
fms32	6	4.327	0.433	0.773	0.732
fms57	5	3.546	0.189	0.722	0.671
fms75	8	6.391	0.478	0.848	0.825
fms89	8	5.696	0.611	0.829	0.802
fms106	3	1.767	0.456	0.436	0.353
fms118	4	1.659	0.122	0.399	0.360
mean	6.58	4.50	0.554	0.731	0.689

表3 暗纹东方鲀3个养殖群体的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量

Tab.3 The numbers of alleles ( $A$ ) and effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Polymorphism Information Content ( $PIC$ ) in three cultured populations of *T. obscurus*

群体 Population	等位基 因数 $A$	有效等位 基因数 $N_e$	观测杂 合度 $H_o$	期望杂 合度 $H_e$	多态信息 含量 $PIC$
GZ	5.000	3.303	0.477	0.647	0.588
SH	5.526	3.722	0.575	0.683	0.633
JS	5.895	4.011	0.612	0.708	0.655

平衡检验, 得其概率值( $P$ )与偏离指数( $d$ ) (表4)。当  $P < 0.05$ , 说明出现平衡偏离。3个群体中都出现位点不同程度偏离 Hardy-Weinberg 平衡的情况, GZ、SH、JS 群体偏离平衡位点数分别为 15、10、10。而偏离指数可得出杂合子缺失( $d < 0$ )的情况, GZ、SH、JS 群体各位点表现出杂合子缺失数值分别为 8、7、4。

## 2.4 群体遗传结构分析

通过 Popgene 1.32 分析软件分析 3 个暗纹东方鲀群体遗传结构, 由基因流( $N_m$ ) (表5)分析其结构可得, 有 7 个位点的  $N_m$  值大于 4, 说明群体间该位点遗传分化程度较小, 有 1 个位点的  $N_m$  值小于 1, 说明群体间该位点遗传分化程度较大, 其余 11 个位点则分化程度一般。由表 5 可见平均遗传分化指数为

表4 概率值( $P$ )与遗传偏离指数( $d$ )

Tab.4 The  $P$  value of Chi-square test and  $d$  value of heterozygote deficiency or excess

位点 Locus	广州 GZ		上海 SH		江苏 JS	
	$P$	$d$	$P$	$d$	$P$	$d$
F0001	0.000**	-0.632	0.000**	-0.341	0.011*	-0.211
F0003	0.005**	-0.117	0.000**	0.504	0.740	-0.139
F0013	0.003**	0.451	0.025*	-0.001	0.001**	-0.206
F0020	0.000**	1.000	0.202	0.176	0.000**	0.800
Tob10	0.022*	0.400	0.117	0.032	0.3804	0.062
Tob11	0.525	0.024	0.597	-0.155	0.391	-0.021
Tob25	0.720	-0.231	0.178	0.319	0.365	0.040
Tob53	0.004**	-0.068	0.022*	-0.010	0.852	-0.133
Tob55	0.007**	0.365	0.138	0.234	0.001**	0.159
Tob61	0.000**	0.410	0.896	-0.046	0.050*	0.248
Tob91	0.014*	0.063	0.002**	0.283	0.080	0.151
Tob107	0.004**	0.246	0.811	0.123	0.000**	0.210
Tob108	0.128	0.085	0.156	-0.077	0.714	-0.094
fms32	0.013*	0.271	0.000**	0.448	0.003**	0.304
fms57	0.000**	0.904	0.000**	0.643	0.000**	0.651
fms75	0.000**	0.538	0.349	0.073	0.000**	0.586
fms89	0.000**	0.582	0.047*	0.145	0.128	-0.101
fms106	0.123	0.048	0.000**	-0.168	0.725	-0.080
fms118	0.000**	0.630	0.000**	0.756	0.000**	0.589

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$

表 5 暗纹东方鲀 3 个不同养殖群体的基因流( $N_m$ )和遗传分化指数( $F_{st}$ )

Tab.5 Genetic diversity coefficient ( $F_{st}$ ) and Gene flow ( $N_m$ ) among three cultured populations of *T. obscurus*

位点 Locus	基因流 $N_m$	遗传分化指数 $F_{st}$
F0001	3.333	0.069
F0003	11.191	0.022
F0013	1.203	0.172
F0020	3.621	0.065
Tob10	3.482	0.067
Tob11	3.838	0.061
Tob25	0.619	0.288
Tob53	2.875	0.080
Tob55	4.407	0.054
Tob61	1.710	0.127
Tob91	12.194	0.020
Tob107	2.050	0.109
Tob108	5.266	0.045
fms32	1.581	0.137
fms57	10.764	0.023
fms75	3.159	0.073
fms89	3.919	0.060
fms106	14.158	0.017
fms118	4.792	0.050
Mean	2.846	0.081

0.081, 表明三群体之间发生了中度的遗传分化。研究的 19 个微卫星位点有 6 个位点的  $F_{st}$  值小于 0.05, 说明其分化程度较小;  $F_{st}$  值在 0.15–0.25 之间有 1 个, 说明分化程度较大;  $F_{st}$  值大于 0.25 有 1 个, 说明分化程度极大; 其余分化程度则较为一般。3 个群体间的平均  $F_{st}$  值(表 6)分别为 0.048、0.062、0.076, 均小于 0.15, 表明总体上 3 个群体间分化较弱, 从而说明个体间的遗传变异成为分化的主因。

表 6 暗纹东方鲀 3 个不同养殖群体间的  $F_{st}$  值比较

Tab.6 Genetic diversity coefficient ( $F_{st}$ ) between each population of *T. obscurus*

群体 Population	广州 GZ	上海 SH	江苏 JS
GZ	—	—	—
SH	0.076	—	—
JS	0.048	0.062	—

三群体间的遗传相似性系数( $I$ )和遗传距离( $D$ )由 Nei(1978)的方法计算得出(表 7), GZ 和 JS 群体间的遗传距离为 0.204, 关系最接近; GZ 和 SH 群体间的遗传距离为 0.351, 关系最远。根据 3 个群体之间的遗传距离进行聚类(图 2): GZ 群体和 JS 群体聚为一类, SH 群体单独为一支。

表 7 遗传相似性系数及距离

Tab.7 The genetic identity( $I$ ) and genetic distance( $D$ )

群体 Population	广州 GZ	上海 SH	江苏 JS
GZ	—	0.704	0.816
SH	0.351	—	0.730
JS	0.204	0.315	—

注: 对角线以上为遗传相似性系数; 对角线以下为遗传距离

Note: Above the diagonal is the genetic distance and below is genetic identity

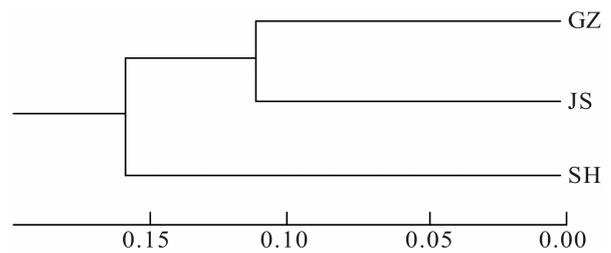


图 2 暗纹东方鲀 3 个养殖群体的聚类

Fig.2 The dendrogram of three cultured populations of *T. obscurus*

### 3 讨论

遗传多样性可衡量生物所携带遗传信息的变异程度, 群体的遗传多样性每丧失 10%, 就会对其繁育能力、存活率、生长等重要性状产生很大的负面影响(Allendorf *et al*, 1987)。Hines 等(1981)指出, 有效等位基因数越接近所检测到的等位基因的绝对数, 等位基因在群体中分布越均匀。本研究中 F0001、F0013、Tob11 和 fms118, 4 个位点的有效等位基因数与观察数相差较大, 表明等位基因分布不均匀; F0003、Tob61、Tob91 和 fms75, 4 个位点的有效等位基因数与观察数相差较小, 表明等位基因分布较为均匀。多态信息含量  $PIC$  和期望杂合度  $H_e$  都是遗传多样性的度量指标, 其数值越大, 说明基因丰富度越高(Wright *et al*, 1981)。程长洪等(2012)对 4 个暗纹东方鲀群体的 26 个位点进行微卫星分析得到  $PIC$  值为 0.601–0.638。王伟等(2004)采用 10 对微卫星引物对山东牙鲆养殖群体进行多样性检测所得的  $PIC$  值为 0.59–0.84。本研究筛选出的 19 个微卫星位点中,  $PIC$  值大于 0.5 的有 16 个, 多态性高;  $PIC$  值在 0.25–0.50 之间的有 3 个, 多态性中等。说明筛选的微卫星位点多态性较为丰富。江苏、上海、广州群体的平均  $PIC$  值分别为 0.655、0.633 和 0.588, 数值依次减小, 但其数值都大于 0.5, 表明该 3 个养殖群体遗传多样性较为丰富, 且江苏群体的基因丰富度稍大于上海和广

州群体。

杂合度反映了群体遗传结构变异程度的高低,杂合度越高物种遗传多样性越丰富,对环境适应能力则越强(蒙子宁等, 2003)。郝君等(2006)对两个不同红鳍东方鲀群体进行微卫星分析得到的杂合度为 0.343–0.451; 李建林等(2012)分析框镜鲤、黑龙江鲤、荷包红鲤、兴国红鲤、黄河鲤和建鲤 6 个鲤鱼群体遗传多样性的期望杂合度为 0.564–0.705; 刘海金等(2008)利用 16 对微卫星引物对牙鲆的 5 个养殖群体进行遗传多样性分析, 杂合度为 0.206–0.818。本研究 3 个群体的期望杂合度由大到小依次为: JS 群体(0.708)、SH 群体(0.683)、GZ 群体(0.647), 说明 3 个暗纹东方鲀群体的杂合度处于较高水平。观测杂合度值越接近期望杂合度值, 表明该品种受外来选择及近交等因素的影响越小, 群体越接近遗传平衡状态(张爱玲等, 2006)。三群体的观测杂合度和期望杂合度差值从小到大为 JS (0.096) < SH (0.108) < GZ (0.169), 可见广州群体相对于上海和江苏群体, 受到的人工选择及近交等因素影响要大。对 3 个暗纹东方鲀群体的 19 个位点的期望杂合度进行 Kruskal-Wallis 分析, 其结果( $H=1.841$ ,  $df=2$ ,  $P=0.398$ )表明三群体的遗传多样性虽然较为丰富, 但其差异并不显著。

Hardy-Weinberg 平衡是指在一个无限大的随机婚配的群体里, 在没有迁移、突变和选择的条件下, 群体中个基因频率和基因型频率保持世代不变, 即处于一种平衡状态(黄代新等, 2004)。本研究中 3 个群体都有位点出现了不同程度偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象, 其中位点 F0001、F0013、fms32、fms57、fms118 在三群体中都偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 位点 F0003、Tob53、Tob91 和 fms89 只在 GZ 和 SH 群体中出现偏离, 位点 F0020、Tob55、Tob61、Tob107 和 fms75 只在 GZ 和 JS 群体中出现偏离。出现偏离 Hardy-Weinberg 平衡这一现象的原因可能是: 养殖群体普遍存在人工选择亲本的现象造成近亲交配几率的增加, 从而导致纯合子过剩情况的发生; 群体由于生态环境恶化、产卵场遭受破坏和养殖群体亲本的数量限制, 导致建立者效应的产生: 由遗传突变和迁移等原因引起不平衡情况。上述三方面可导致遗传偏离情况发生, 但具体是何种原因起作用还有待于进一步的探究。Hardy-Weinberg 平衡的遗传偏离指数则反映了  $H_o$  和  $H_e$  之间的平衡关系,  $d$  值越接近 0, 基因型的分布越接近于平衡状态,  $d$  值为正时反映杂合子过剩,  $d$  值为负时反映杂合子处于缺失状态(李鹏飞等, 2006)。由遗传偏离指数得到 3 个养殖群体都不同程度出现了杂合子缺失的现象, 而 F0001、Tob53 两个

基因座杂合子在 3 个群体中都出现了缺失现象, 这两个基因座位可能是基因组中的重组热点, 可能由于近交情况的普遍存在而使养殖群体在这些基因座位发生纯合, 进而导致杂合度降低(张志伟等, 2006)。

群体间的遗传分化程度可由遗传分化指数( $F_{st}$ )来衡量,  $F_{st}$  为 0–0.05 说明群体间的遗传差异很小,  $F_{st}$  为 0.05–0.15 说明群体间存在中等程度的遗传差异,  $F_{st}$  为 0.15–0.25 说明遗传差异较大,  $F_{st}>0.25$  说明遗传差异很大(Wright, 1978)。王长忠等(2008)利用 39 个微卫星位点对长江中上游两个鲢群体进行遗传多样性分析, 得到  $F_{st}$  值为 0.089; 王蕾等(2010)对 4 个不同海域群体的牙鲆的 30 个位点进行微卫星分析, 得到四群体分化程度  $F_{st}=0.086$ 。由研究结果可知, GZ 群体与 JS 群体间的  $F_{st}$  值为 0.048, 其分化程度最低, GZ 群体与 SH 群体间  $F_{st}$  值为 0.076, 其分化程度最高; 三群体的平均遗传分化指数为 0.081, 表明有 8.08% 的变异发生在群体之间, 91.92% 发生于群体内个体之间。当  $N_m<1$  时, 基因流不足以抵制群体间的遗传漂变;  $N_m>1$ , 基因流起主要作用, 足以抵制群体间的遗传漂变(刘博等, 2011)。本研究 3 个群体的平均基因流值  $2.846>1$ , 说明群体间发生了一般程度的基因交流, 足矣抵制群体间的遗传漂变。

由微卫星得出的遗传距离更能反映分化时间的长短, 能客观反映品种间的遗传变异和分化(Crawford *et al*, 1998)。崔建洲等(2005)利用 9 对微卫星引物对两个红鳍东方鲀和一个假睛东方鲀群体进行 DNA 多态性分析, 得到遗传距离为 0.059–0.092。谷晶晶等(2010)对 16 尾红鳍东方鲀进行微卫星分析, 得到个体间遗传距离为 0.626–0.998。Shaklee 等(1982)综合已发表的资料, 提出鱼类在属、种和种群级水平上的遗传距离  $D$  平均值分别为 0.90、0.30 及 0.05 的分类依据。本研究中得到 GZ 和 JS 两群体之间的遗传距离最近为 0.204, 该值大于种群分类标准(0.05–0.30), 可划为同种不同种群, 而 GZ 和 SH 群体、SH 和 JS 群体间的遗传距离分别为 0.315、0.351, 都略大于种的划分, 说明种群间已出现了种的分化。结果相对于谷晶晶等(2010)的红鳍东方鲀个体间的遗传距离, 表明 3 个群体间的亲缘关系较近, 遗传虽有分化, 但程度较低。根据 3 个群体的遗传距离采用 UPGMA 法进行聚类, GZ 和 JS 群体聚为一支, SH 群体单独为一支。聚类结果可能是由于广州养殖的暗纹东方鲀群体有一部分是来自江苏地区, 从而部分广州和江苏的亲本亲缘关系较近, 导致其子代群体的遗传距离较近, 而上海的养殖群体来源较为复杂, 导致和广州、江苏群体的亲缘关系相对较远。

本研究进行的暗纹东方鲀3个养殖群体遗传多样性分析的结果不仅基本符合3个养殖群体的养殖环境,也反映出各群体的遗传多样性比较丰富,并具有一定程度的遗传分化。研究发现3个群体都出现了杂合子普遍缺失的现象,可能由于该样本都为养殖群体的原因,导致了近交机会增大;繁殖亲本的数量限制使得有些种群正在逐渐变小,进而造成纯合子增多、杂合子减少。本研究为今后的暗纹东方鲀苗种选育和遗传改良提供了理论基础。在进行育种操作时,适宜挑选亲缘关系较远且有一定遗传分化的群体作为亲本,避免近亲交配的发生;同时加大放流力度,控制好放流的种质质量,同群体多地理区域放流,以此来减缓暗纹东方鲀遗传多样性的衰退,达到保护暗纹东方鲀种质资源和丰富养殖群体遗传多样性的目的。

### 参 考 文 献

- 王长忠, 梁宏伟, 邹桂伟, 等. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析. 遗传, 2008, 30(10): 1341-1348
- 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. 海洋与湖沼, 2004, 35(6): 530-537
- 王蕾, 张立东, 万玉美, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析. 遗传, 2010, 32(10): 1057-1064
- 古川聪史. 红鳍东方鲀与高生长性状有关的遗传学及分子生物学的研究. 2009. 日本: 东京大学学院农学生命科学研究科, 15-65
- 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. 中国水产科学, 2008, 15(1): 30-37
- 刘金海, 张正, 王印庚, 等. 盐度对寄主暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)存活影响及其对车轮虫的杀灭作用. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 68-75
- 刘博, 匡友谊, 佟广香, 等. 微卫星分析9个哲罗鱼野生群体的遗传多样性. 动物学研究, 2011, 32(6): 597-604
- 杜长斌, 孙孝文, 楼允东, 等. 微卫星在水产动物种质资源研究方面的应用. 水产学杂志, 2000, 13(1): 68-73
- 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. 动物学研究, 2006, 27(2): 189-196
- 李建林, 李红霞, 唐永凯, 等. 利用微卫星标记分析6个鲤鱼群体的遗传差异. 福建农业学报, 2012, 27(9): 936-940
- 陆丽君, 马爱军, 王新安, 等. 5个红鳍东方鲀养殖群体微卫星DNA遗传多态性分析. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 27-33
- 吴建新. 长江野生暗纹东方鲀资源现状与保护对策. 水利渔业, 2002, 22(6): 47-49
- 张爱玲, 马月辉, 李宏滨, 等. 利用微卫星标记分析6个山羊品种遗传多样性. 农业生物技术学报, 2006, 14(1): 38-44
- 谷晶晶, 朱迎军, 孟雪松, 等. 微卫星标记对红鳍东方鲀繁殖的指导应用及遗传分析. 水产科学, 2010, 29(9): 527-531
- 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. 中国水产科学, 2006, 13(1): 13-19
- 郝君, 孙效文, 孟雪松. 红鳍东方鲀微卫星DNA多态性初步分析. 上海海洋大学学报, 2006, 15(1): 21-24
- 黄代新, 杨庆恩. 卡方检验和精确检验在HWE检验中的应用. 法医学杂志, 2004, 20(2): 116-119
- 崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀与假睛东方鲀的微卫星DNA多态性分析. 高技术通讯, 2005, 15(12): 90-96
- 程长洪, 张敏莹, 徐东坡, 等. 4个暗纹东方鲀群体的遗传多样性分析. 华中农业大学学报, 2012, 31(5): 634-640
- 蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 等. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的RAPD分析. 生物多样性, 2003, 11(3): 197-203
- Allendorf FW, Ryman N. Genetic management of hatchery stock. population genetics and fishery management. Seattle: University of Washington Press, 1987: 141-159
- Botstein D, White RL, Skolnich M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331
- Crawford AM, Littlejohn RP. The use of DNA markers in deciding conservation priorities in sheep and other livestock. Anim Genet Res Inf, 1998, 23(1): 21-26
- Hines HC, Zikakis JP, Haenlein GF, et al. Linkage relationships among loci of polymorphisms in blood and milk of cattle. Dairy Sci, 1981, 64(1): 71-76
- Ma HY, Chen SL, Liao XL, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of obscure puffer (*Takifugu obscurus*) and cross-species amplification. Conserv Genet, 2009, 10(4): 955-957
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89(3): 583-590
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 1975, 29(1): 1-10
- Shaklee JB, Tamaru CS, Waples RS. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. Pac Sci, 1982, 36(2): 141-157
- Wright S. Evolution and the genetics of populations. University of Chicago Press, 1978: 1-30

(编辑 冯小花)

## Study on the Genetic Structure of Three Cultured Populations of *Takifugu obscurus* with Microsatellite Markers

ZOU Jie<sup>1,2</sup>, MA Aijun<sup>1①</sup>, ZHAO Yanfei<sup>1</sup>, HE Weiguo<sup>1</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, YUE Liang<sup>1</sup>,  
LIU Dayong<sup>3</sup>, GUO Zhenglong<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Jiangsu Zhongyang Group Limited by Share Ltd, Nantong 226600)

**Abstract** In recent years the aquaculture *Takifugu obscurus* has been impeded due to the adverse changes in the ecological environments and in the hydrological conditions of the Yangtze River. Here we evaluated the genetic diversity of three cultured populations of *T. obscurus* and hence provided theoretical data for the potential improvement in *T. obscurus* genetics. We used 21 pairs of microsatellite primers to analyze the genetic variances between the populations with SSR molecular marker technique, and successfully amplified 19 microsatellite markers. In three populations of *T. obscurus*, the number of alleles ( $A$ ) was 3–11 with an average of 6.58; the effective number of alleles ( $N_e$ ) was 1.7–7.8 with an average of 4.5; the value of average observed heterozygosities was 0.156–1.000; the expected heterozygosities ( $H_e$ ) was 0.399–0.876 and the mean polymorphic information content ( $PIC$ ) ranged from 0.353 to 0.858. The mean polymorphic information content ( $PIC$ ) followed the order of Guangzhou population (0.588) < Shanghai population (0.633) < Jiangsu population (0.655). The genetic diversity coefficients were 0.048, 0.062, and 0.076 respectively with an average of 0.081. There was moderate genetic differentiation among the three populations. The genetic distances between each population and the UPGMA dendrogram showed that Guangzhou population and Shanghai population had the most remote relationship (0.351), and that Guangzhou population and Jiangsu population were the closest (0.204). The three populations were pooled into 2 groups in the cluster analysis—the Guangzhou/Jiangsu group and the Shanghai group. These results suggested that there was a low level of polymorphism information content and moderate genetic diversity in the three populations of *T. obscurus*. Noticeably the genetic diversity of the farmed Jiangsu population was higher than that of the farmed Guangzhou and Shanghai populations, so there was a high potential in selective breeding. Our study broadened the knowledge on the genetics of *T. obscurus* and provided necessary information for the artificial breeding.

**Key words** *Takifugu obscurus*; Cultured population; Microsatellite; Genetic diversity

① Corresponding author: MA Aijun, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn