

# 三倍体牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)群体 遗传多样性的微卫星分析\*

刘 慧<sup>1</sup> 吴志昊<sup>2</sup> 李 桢<sup>1①</sup> 朱香萍<sup>1</sup> 尤 锋<sup>2①</sup>  
宋宗诚<sup>3</sup> 李 军<sup>4</sup> 胡金伟<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学 青岛 266109; 2. 中国科学院实验海洋生物学重点实验室  
中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 3. 威海圣航水产科技有限公司 威海 264200;  
4. 海洋生物工程技术研究发展中心 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**摘要** 采用微卫星遗传标记技术对三倍体牙鲈群体及二倍体对照群体进行比较分析。取 2012 年冷休克诱导和培育至 11 月龄的三倍体及同期二倍体对照牙鲈个体各 32 尾, 通过高盐法提取肌肉组织总 DNA; 利用筛选得到的 21 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 并经 14% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分型后, 进行人工判读和分析。结果显示, 21 个微卫星位点均为多态, 二倍体和三倍体群体的平均等位基因数( $A$ )、基因型总数、平均有效等位基因数( $a_e$ )、平均观测杂合度( $H_O$ )和平均期望杂合度( $H_E$ )分别为 5.6 和 5.0、190 和 142、3.7 和 2.8、0.613 和 0.868、0.681 和 0.629。二倍体和三倍体群体的多态信息含量( $PI_C$ )分别为 0.642 和 0.589, 个体识别率( $DP$ )为 0.660 和 0.609, 非父排除率( $PPE$ )为 0.482 和 0.399, 其累积个体识别率和非父排除率均达到 0.999, 表明所选座位均属中高识别力的遗传标记, 可以将它们应用于今后牙鲈雌核发育群体的遗传变异分析以及进一步的遗传育种的研究中。二倍体和三倍体群体间的遗传距离( $D$ )为 0.312, 遗传相似系数( $I$ )为 0.732, 基因分化系数( $G_{ST}$ )为 0.971。以上结果说明, 三倍体诱导对牙鲈的遗传结构造成了一定影响, 导致三倍体遗传多样性水平相对二倍体有所下降, 二倍体和三倍体牙鲈的基因型也存在一定差异。

**关键词** 牙鲈; 三倍体; 人工诱导; 微卫星; 遗传多样性

**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0033-08

三倍体鱼类通常性腺发育异常, 可将性腺发育所需的能量转换到生长上, 一般具有较高的生长速度; 同时, 因其不育或低育, 也可避免品种混杂和退化, 对控制养殖鱼类的过度繁殖和保护天然种质资源具有极其重要的意义。早在 1943 年, Makino 等开始了人工诱导三倍体鲤(*Cyprinus carpio*)的研究。1958 年, Swarup 等成功将三倍体刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)培育至成鱼, 并比较了它们与正常二倍体在生长和性

腺发育方面的异同。经过 60 多年的研究, 鱼类三倍体诱导技术已经比较成熟, 并在大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等几十种鱼类中取得成功, 有的甚至已经应用于养殖生产。目前, 对鱼类三倍体的研究多集中在诱导和生长观察上(楼允东, 1984; Maxime, 2008), 关于遗传结构的报道较少。刘琳(2008)<sup>1</sup>利用同

\* 国家 863 计划资助项目(2012AA10A402)、山东省自然科学基金项目(ZR2011CM035)、山东省科技发展计划项目(2013GHY11526)和鲆鲽类产业技术体系和苗种繁育项目科学家课题(NYCYTX-50)共同资助。刘 慧, E-mail: liuhuifeifei@126.com

① 通讯作者: 李 桢, 副教授, E-mail: zacheryli2012@126.com; 尤 锋, 研究员, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

收稿日期: 2014-03-20, 收修改稿日期: 2014-06-25

1) 刘琳. 应用 DNA 及同工酶遗传标记检测分析二、三倍体鲫鱼的遗传结构. 天津师范大学硕士学位论文, 2008, 22-35

工酶对鲫鱼(*Carassius auratus*)的二、三倍体的遗传结构进行了检测, Liu 等(1996)也利用同工酶对三倍体鲶鱼(*Silurus asotus*)进行了比较分析,发现人工诱导导致三倍体部分等位基因缺失,并使其遗传多样性下降。

微卫星具有共显性、多态性高、重复性好等优点(田吉腾等, 2013), 已在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang *et al*, 2008)、牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Garnier-Géré *et al*, 2002)等三倍体群体的遗传变异分析进行应用。在鱼类中, 微卫星分子标记已用于三倍体染色体来源分析(Alves *et al*, 2004; Nomura *et al*, 2006)和遗传连锁图谱构建等方面(蔡明夷等, 2010), 而用微卫星分析三倍体遗传结构的研究还较少, 仅见于三倍体花鲢(*Poecilia formosa*)的遗传多样性分析(Lampert *et al*, 2005), 国内尚未见到利用微卫星分子标记对三倍体鱼类的遗传多样性进行分析的报道。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)作为一种重要的海洋经济鱼类, 在中国、日本和韩国的渔业中占有重要地位, 也是我国沿海工厂化、池塘和网箱养殖的主要品种之一(臧坤等, 2013)。早在 20 世纪 80 年代, 日本学者就开始了牙鲆三倍体的研究, 并对诱导成功的三倍体牙鲆进行了存活率和生长情况观察(Kazoo *et al*, 1989)。三倍体牙鲆在国内于 1995 年诱导成功, 并开展了核型分析(尤锋等, 1995)、生长(Xu *et al*, 2010)及性腺发育(王磊等, 2011)等方面的研究。本研究用微卫星分子标记对二倍体及三倍体牙鲆群体遗传多样性进行比较, 以期明确三倍体与二倍体群体遗传结构的差异, 并进行鉴别, 可为三倍体牙鲆的深入研究及生产应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

牙鲆三倍体于 2012 年在山东威海圣航水产公司用冷休克法诱导(尤锋等, 1995), 并用同批精卵受精获得的二倍体受精卵作为对照组同步进行培育比较。在初孵仔鱼期, 使用流式细胞仪检测 DNA 含量的方法对三倍体诱导组样品进行倍性检测。取初孵仔鱼 30 尾, 分别轻轻匀浆获得细胞悬浮液, 经分散液分散、DAPI 染色后, 用流式细胞仪(Partec, 德国)测定峰值, 同时以二倍体为对照, 确定诱导组个体的倍性、计算诱导率(蔡明夷等, 2010), 测得本实验三倍体组诱导

率为 100%。对照组与三倍体组牙鲆在相同条件下培育至 11 月龄时, 平均全长分别为(17.80±1.41) cm 和 (19.40±1.72) cm, 平均体重分别为(60.7±14.4) g 和 (85.7±23.6) g。分别随机取 32 尾鱼, 用流式细胞仪再次验证倍性后, 取肌肉组织, 保存于-20℃冰箱中备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 分别剪取上述保存的肌肉组织约 50 mg, 用高盐法提取全基因组 DNA(汪永庆等, 2001), 分别用 1%琼脂糖电泳及 Nanodrop 1000 分光光度计(Thermo, 美国)检测其质量和浓度, 稀释至 50 ng/μl 待用。

**1.2.2 PCR 反应和电泳** 本研究从 Sekino 等(2000)、Kim 等(2003)和高峰涛(2012)<sup>1)</sup>报道的牙鲆微卫星引物中选取 35 对引物, 筛选出 21 对多态性较高的引物用于群体遗传分析(表 1)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系: 2×PCR mix (KCl 100 mmol/L、Tris-HCl 20 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L、dNTPs 400 μmol/L) 12.5 μl, 引物各 4.0 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 50 ng, 加水补至 25 μl。PCR 反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃再延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测后, 用 14%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分型。电泳完毕后用硝酸银进行银染, 照相分析。

**1.2.3 数据统计及分析** 将电泳谱带中的每 1 条 DNA 片段作为该位点的 1 个等位基因来处理, 在相同的迁移位置, 出现 1 条扩增带记录为 1, 无扩增带记录为 0。针对三倍体可能由于 3 个等位基因中有两个等位基因相同而出现两条电泳条带的情况, 可以通过比较银染条带染色的深浅来判断, 认为染色较深的电泳条带为两个等位基因的叠加, 记录为 2。参照王伟等(2004), 计算了每个微卫星座位的平均等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、多态座位观测杂合度( $H_o$ )与无偏倚预期值( $H_e$ )、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ )以及群体平均杂合度( $H$ )来考察群体内的遗传变异水平; 同时计算遗传相似性系数( $J$ )、遗传距离( $D$ )和基因分化系数( $G_{ST}$ )来研究三倍体与二倍体对照群体间的遗传变异水平; 并计算了每个座位上的多态信息含量( $PIC$ )、个体识别率( $DP$ )和非父排除率( $PPE$ ), 用来评价所选标记在个体识别和亲权鉴定上的应用价值。

1) 高峰涛. 牙鲆微卫星遗传连锁图谱的构建. 中国海洋大学博士学位论文, 2012, 36-56

表 1 实验所用 21 个微卫星标记、退火温度及其引物序列

Tab.1 Annealing temperatures and primer sequences of 21 microsatellite loci used in the study

序号 No.	位点 Locus	退火温度 Annealing temperature (°C)	引物序列 Primer sequence (5'-3')
1	kop7	67	F: GTGACACACCTCTGCTTCCTG R: GAGGACGTGGTTGAGATCACAG
2	kop8	67	F: ACTTCACCCCAGAGACAAGCC R: GGCTGTCTCAGGAACTGTGGAG
3	kop12	65	F: CTTGGCTGTCAGGAACTGTG R: CTTCCAGCAGCAACAGGTTTAC
4	kop15	62	F: ACTGGATGCCTCACTTATACC R: GATTCTCACGTTTCCATGTC
5	kop18	67	F: GAAGGATCTGGACTCATGGTGAC R: CAGCAGCAAAGGCAGAAAGAG
6	kop22	62	F: GTGTATGTGTTTCGTTTCCTGC R: TGAAGGCTGTTGTGTGTAG
7	kop23	65	F: TCGATGAGTGTCTCGCAACTA R: ACCGCAGTCTGCAGTTCCTCT
8	kop26	60	F: CAGTAAAACAGTCCCTCCTGAAC R: GGAGTCTGGAACCAAATGTCTG
9	po-str1	58	F: GATTGTTTCAGTACCTGTTCAACCTG R: TCATTAACAGACGGAGCACCC
10	po1	55	F: GCCTTTTGTCTCAGCCATTAACAGAGC R: CTGAGGCCAGACATGACATTACCTT
11	po13	58	F: CGGCCTAAACCTGGACATCCTCTCTA R: CGGGACAACGGAGGTTTGACTGAC
12	po42	55	F: CGAGCGCTGTTTCAACTACGGTTCATT R: ATGATGATCTAACCGTCCGGCTCCAT
13	po48	55	F: GCCTCCAGAAACATTTATGGGG R: TGTCTTGCCTCTGGTCCTTCTT
14	po56	55	F: TCGAGCGTAAACAAACCAGCTAACA R: GCTGAAAATCGCTTTAGCTTCCCAT
15	po89	60	F: ATCAGAAGTCATCCATGCACTGGCAC R: AGCTACTTATCCACAGGTGTCGACGG
16	po91	55	F: AGGTTTCAAGGTGTTTCATTGCGAGTC R: TAAAGGAAGTGCCTCACTGTGGAGAA
17	jn900512	57.5	F: CCTCACAATGATGGCATTGAACC R: AGCCTAATGGTCAGCTGTGTT
18	jn900519	57.5	F: CCTGAGCATGACACTTGCGAG R: GTTTCTGTCTCAGGTGCGTGAG
19	jn900522	57.5	F: TCACAGCCATGATGAGGAGTTTC R: CATCAACTGAGGGATGTCGCTA
20	jn900527	57.5	F: TTAAGTCTCAGTGGGAACTGG R: CCTTTCTATGGATCTGGGTCCG
21	jn900530	57.5	F: GAGTCATAGATGGGAACCTGCA R: TGATATGTGGCATCCTGGCA

## 2 结果

使用 21 对微卫星引物对二倍体和三倍体牙鲆群体各 32 尾进行分析,二倍体个体的等位基因数为 1-2 个,三倍体个体的等位因数为 1-3 个。部分引物的扩增图谱见图 1,两个群体的 21 个微卫星位点的等位基因频率见表 2。

二倍体和三倍体牙鲆群体每个位点的等位基因数、有效等位基因数、多态位点杂合度的观测值、无偏倚预期值及遗传偏离指数见表 3。二倍体在 21 个微卫星位点检测到等位基因 3-10 个,三倍体检测到等位基因 3-7 个;有效等位基因数分别为 3.7 和 2.8;二倍体和三倍体群体的平均期望杂合度分别为

0.681、0.629。二倍体群体在 15 个位点遗传偏离指数为负值,而三倍体中仅有两个。

在二倍体和三倍体群体中,21 个微卫星位点的 *PIC* 分别为 0.115-0.828 和 0.328-0.781, *DP* 分别为 0.119-0.834 和 0.400-0.788, *PPE* 分别为 0.103-0.707 和 0.169-0.627,其累积个体识别率和非父排除率都大于 0.999,属于中高识别力的遗传标记系统(表 4)。二倍体和三倍体的遗传距离为 0.312,遗传相似系数为 0.732,基因分化系数为 0.971。

## 3 讨论

微卫星 DNA 在基因组中广泛而随机分布,具有

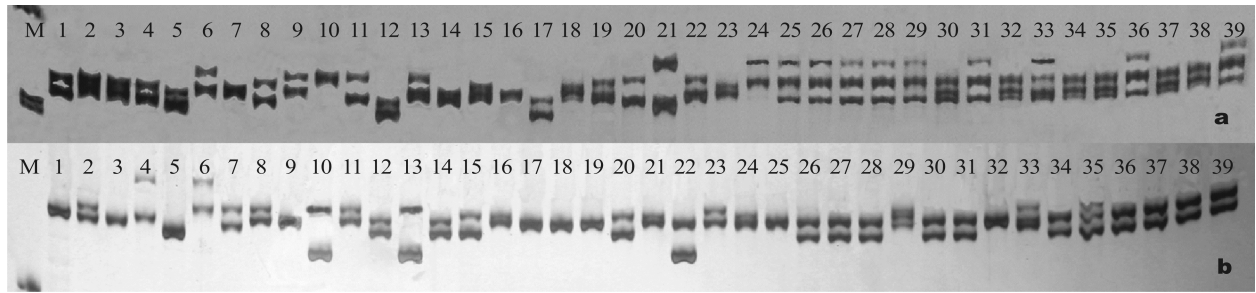


图1 二倍体和三倍体牙鲈部分个体微卫星引物 jn900519(a)、po56(b)扩增电泳图谱

Fig.1 The electrophotographs of microsatellite markers, jn900519(a) and po56(b) in diploid and triploid *Paralichthys olivaceus*

M: DNA 100 bp ; 1、5: 父本 ; 2-4、6、7: 母本 ; 8-23: 二倍体 ; 24-39: 三倍体  
M: DNA 100 bp ladder; 1, 5: Paternal; 2-4, 6, 7: Maternal; 8-23: Diploid; 24-39: Triploid

表2 二倍体和三倍体牙鲈21个微卫星位点的等位基因频率  
Tab.2 Allele frequencies of 21 microsatellites loci in diploid and triploid *P. olivaceus*

位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid	位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid
kop7	1	0.000	0.229	po13	1	0.047	0.021
	2	0.078	0.021		2	0.047	0.010
	3	0.016	0.010		3	0.093	0.229
	4	0.156	0.000		4	0.063	0.031
	5	0.156	0.042		5	0.063	0.063
	6	0.219	0.656		6	0.375	0.500
	7	0.375	0.042		7	0.312	0.146
kop8	1	0.093	0.000	po42	1	0.110	0.000
	2	0.016	0.302		2	0.359	0.281
	3	0.000	0.021		3	0.046	0.344
	4	0.891	0.677		4	0.453	0.052
5	0.016	0.021	5		0.031	0.323	
kop12	2	0.047	0.302	po48	1	0.062	0.010
	3	0.937	0.677		2	0.000	0.261
	4	0.016	0.021		3	0.172	0.000
kop15	1	0.078	0.000	po56	4	0.766	0.729
	2	0.141	0.010		1	0.141	0.052
	3	0.187	0.625		2	0.078	0.094
	4	0.141	0.052		3	0.500	0.573
	5	0.359	0.292		4	0.031	0.042
	6	0.094	0.021		5	0.125	0.239
kop18	1	0.031	0.021	po89	6	0.125	0.000
	2	0.156	0.042		1	0.031	0.010
	3	0.203	0.239		2	0.250	0.073
	4	0.250	0.094		3	0.297	0.156
	5	0.266	0.583		4	0.375	0.125
	6	0.094	0.021		5	0.047	0.636
kop22	1	0.141	0.104	po91	1	0.031	0.490
	2	0.078	0.125		2	0.063	0.052
	3	0.234	0.104				

续表 2

位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid	位点 Locus	等位基因 Allele	二倍体 等位基因频率 Allele frequency of diploid	三倍体 等位基因频率 Allele frequency of triploid	
kop23	4	0.234	0.052	jn900512	3	0.156	0.000	
	5	0.063	0.563		4	0.031	0.010	
	6	0.250	0.052		5	0.391	0.219	
	1	0.187	0.000		6	0.266	0.125	
	2	0.203	0.292		7	0.062	0.104	
	3	0.109	0.094		1	0.125	0.031	
	4	0.078	0.260		2	0.312	0.469	
kop26	5	0.063	0.000	jn900519	3	0.422	0.292	
	6	0.219	0.312		4	0.094	0.177	
	7	0.141	0.042		5	0.047	0.031	
	1	0.250	0.240		1	0.000	0.188	
	2	0.110	0.010		2	0.141	0.333	
	3	0.063	0.083		3	0.187	0.177	
	4	0.031	0.104		4	0.281	0.302	
po-str1	5	0.047	0.219	jn900530	5	0.250	0.000	
	6	0.250	0.042		6	0.141	0.000	
	7	0.234	0.302		1	0.000	0.021	
	1	0.063	0.000		2	0.016	0.010	
	2	0.063	0.000		3	0.016	0.177	
	3	0.063	0.000		4	0.234	0.042	
	4	0.297	0.229		5	0.734	0.750	
	5	0.109	0.000		jn900527	1	0.047	0.302
	6	0.218	0.000			2	0.125	0.021
	7	0.031	0.000			3	0.640	0.302
8	0.047	0.302	4	0.047		0.031		
po1	9	0.047	0.333	jn900522	5	0.000	0.302	
	10	0.047	0.136		6	0.141	0.042	
	1	0.156	0.250		1	0.235	0.323	
	2	0.344	0.063		2	0.250	0.000	
	3	0.172	0.063		3	0.203	0.625	
	4	0.172	0.250		4	0.156	0.042	
	5	0.063	0.010	5	0.125	0.000		
	6	0.093	0.364	6	0.031	0.010		

多态性高、共显性等优点, 已经成为分子系统学、种群遗传学及生态学研究中最重要分子标记之一。遗传标记的应用价值可用多态信息含量  $PIC$  来衡量。一般情况下,  $PIC$  能反映出某一个遗传标记所包含的或所能提供的遗传信息的容量, 当  $PIC > 0.5$  时, 表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性; 当  $0.25 < PIC < 0.5$  时, 表明该遗传标记能够较为合理地提供遗传信息; 而当  $PIC < 0.25$  时, 表明该遗传标记可提供的遗传信息性较差(侯仕营等, 2011)。本研究对牙鲆二

倍体及三倍体群体微卫星分析的结果显示, 二、三倍体的多态信息含量  $PIC > 0.5$  的位点分别有 17 个和 16 个, 可提供较多的遗传信息。二倍体群体中有两个位点的  $PIC < 0.25$ , 但在三倍体群体中, 这两个位点的  $PIC > 0.25$ , 仍能够提供合适的遗传信息, 故本研究中并未将这两个位点舍弃。

遗传杂合度是反映群体遗传变异的重要参数, 可从一定程度上代表该群体的遗传多样性水平。本研究中牙鲆二倍体群体的平均期望杂合度为 0.681。王伟

表3 二倍体和三倍体牙鲆在21个微卫星位点的等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $a_e$ )、多态座位观测杂合度( $H_o$ )、无偏倚预期值( $H_e$ )和Hardy-Weinberg遗传偏离指数( $d$ )

Tab.3 Number of allele ( $A$ ), number of effective allele ( $a_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Hardy-Weinberg genetic deviation index ( $d$ ) at the 21 microsatellite loci assessed in diploid and triploid *P. olivaceus* stocks

位点 Locus	二倍体 Diploid					三倍体 Triploid				
	$A$	$a_e$	$H_o$	$H_e$	$d$	$A$	$a_e$	$H_o$	$H_e$	$d$
kop7	6	4.1	0.719	0.781	-0.080	6	2.1	0.813	0.531	0.531
kop8	3	1.2	0.188	0.204	-0.082	3	1.8	0.875	0.456	0.919
kop12	3	1.1	0.125	0.123	0.020	3	1.8	0.906	0.464	0.951
kop15	6	4.6	0.719	0.806	-0.109	5	2.1	0.938	0.538	0.742
kop18	6	4.8	0.906	0.817	0.109	6	2.4	0.969	0.610	0.588
kop22	6	4.9	0.781	0.824	-0.052	6	2.8	0.594	0.659	-0.099
kop23	7	6.0	0.656	0.861	-0.238	5	3.8	1.000	0.763	0.311
kop26	7	5.0	0.719	0.825	-0.128	7	4.6	0.875	0.808	0.083
po-str1	10	5.5	0.656	0.846	-0.224	4	3.7	0.938	0.750	0.250
po1	6	4.7	0.875	0.811	0.079	6	3.8	0.906	0.762	0.190
po13	7	3.9	0.844	0.765	0.104	7	3.2	0.969	0.714	0.358
po42	5	2.9	0.500	0.671	-0.255	4	3.3	0.938	0.718	0.306
po48	3	1.6	0.500	0.393	0.273	3	1.7	0.813	0.413	0.966
po56	6	3.2	0.625	0.714	-0.125	5	2.5	0.906	0.621	0.460
po89	5	3.4	0.656	0.728	-0.099	5	2.2	0.563	0.569	0.021
po91	7	3.9	0.594	0.767	-0.225	6	3.2	0.594	0.705	-0.158
jn900512	5	3.3	0.531	0.720	-0.262	5	3.0	1.000	0.683	0.464
jn900519	5	4.6	0.656	0.809	-0.189	4	3.7	1.000	0.755	0.325
jn900522	6	5.0	0.719	0.826	-0.130	4	2.0	1.000	0.520	0.925
jn900527	5	2.4	0.406	0.596	-0.318	6	3.6	1.000	0.748	0.336
jn900530	4	1.7	0.500	0.419	0.195	5	1.7	0.625	0.417	0.499
平均 Average	5.6	3.7	0.613	0.681	-0.083	5.0	2.8	0.868	0.629	0.426

等(2004)用10个微卫星位点对1个牙鲆养殖群体进行检测,其平均期望杂合度为0.731,略高于本研究结果;其平均等位基因数、平均有效等位基因数及平均观测杂合度也均略高于本研究所分析的牙鲆二倍体。这可能是由于本研究的牙鲆二倍体群体属于养殖群体,经过多年的累代养殖,导致其遗传多样性水平略有下降。但总体来说,本研究中二倍体和三倍体牙鲆的遗传多样性水平尚可。

本研究中,由于二倍体细胞中含有两套染色体组,因此个体中含有两个等位基因,若为纯合子,则电泳图谱为1条带,若为杂合子,则电泳图谱为2条带;同理,三倍体细胞中含有三套染色体组,电泳图谱表现为1-3条带。对两个群体的遗传多样性指标进行比较,发现三倍体的遗传多样性水平略低,其平均等位基因数、平均有效等位基因数及平均期望杂合度均低于三倍体群体。由于三倍体是通过冷休克诱导的方式获得的,这一诱导过程可视为对群体进行的人工

选择,一些含有特定等位基因或基因型的个体对低温诱导较为敏感,不能存活,导致该等位基因的缺失。本研究中,三倍体群体相对其二倍体对照群体,在kop7、kop8、kop15、kop23、po-str1、po42、po48、po56、jn900519、jn900530等10个位点均出现等位基因缺失,甚至在po-str1位点等位基因缺失所占比例超过50%。由表2看出,三倍体群体中,个别等位基因在二倍体群体中没有出现,比例占3.23%,其原因可能是由于分析的样品量(30尾)较少,部分稀有等位基因未在二倍体群体中被检测到,还是由于无效等位基因的原因,尚需要进一步研究。

同时,二倍体群体的基因型数目也明显高于三倍体群体,如图1-a引物jn900519在二倍体中扩增出8种基因型、6个等位基因,而在三倍体仅扩增出3种基因型、4个等位基因。21对引物在二倍体群体中共扩增出190种基因型,而三倍体仅有142种。类似的结果也出现在三倍体多米尼亚花鲈(*P. formosa*)

表 4 二倍体和三倍体牙鲆 21 个微卫星位点上的多态信息含量(PIC)、个体识别率(DP)和非父排除率(PPE)

Tab.4 The value of polymorphism information content (PIC), power of discrimination (DP) and probability of paternity exclusion (PPE) at 21 microsatellite loci in diploid and triploid *P. olivaceus* stocks

位点 Locus	二倍体 Diploid			三倍体 Triploid		
	PIC	DP	PPE	PIC	DP	PPE
kop7	0.739	0.756	0.564	0.512	0.514	0.300
kop8	0.197	0.198	0.103	0.456	0.456	0.236
kop12	0.115	0.119	0.059	0.366	0.450	0.193
kop15	0.771	0.781	0.609	0.519	0.521	0.299
kop18	0.774	0.791	0.608	0.584	0.591	0.387
kop22	0.790	0.798	0.630	0.634	0.638	0.464
kop23	0.828	0.834	0.689	0.723	0.739	0.532
kop26	0.790	0.799	0.632	0.781	0.783	0.627
po-str1	0.815	0.819	0.707	0.693	0.727	0.495
po1	0.771	0.786	0.608	0.737	0.738	0.552
po13	0.712	0.741	0.538	0.680	0.691	0.474
po42	0.645	0.650	0.435	0.676	0.696	0.514
po48	0.346	0.380	0.194	0.328	0.400	0.169
po56	0.688	0.692	0.511	0.594	0.601	0.398
po89	0.669	0.706	0.467	0.537	0.551	0.352
po91	0.720	0.743	0.545	0.680	0.683	0.493
jn900512	0.657	0.698	0.465	0.619	0.662	0.418
jn900519	0.764	0.784	0.593	0.711	0.731	0.514
jn900522	0.785	0.800	0.624	0.420	0.503	0.236
jn900527	0.566	0.577	0.345	0.725	0.725	0.491
jn900530	0.346	0.405	0.187	0.402	0.404	0.234
平均 Average	0.642	0.660	0.482	0.589	0.609	0.399

(Lampert *et al.*, 2005)和三倍体牡蛎(*C. gigas*) (Garnier-Géré *et al.*, 2002)中,三倍体部分基因型缺失,表现出遗传多样性的下降。由表 3 可以看出,三倍体群体中的平均观测杂合度多高于二倍体群体。鱼类卵子排出体外时处于第二次减数分裂中期,与精子体外受精后的一段时间内排出第二极体,形成二倍体受精卵(Maxime, 2008; Piferrer *et al.*, 2009)。由于第一次减数分裂时同源染色体之间发生了交换,造成基因重组,卵刚排出体外时所含的两套遗传物质可能不完全相同,也即第二极体中的遗传物质与卵子的遗传物质并不完全一致,由于三倍体牙鲆是通过冷休克处理抑制第二极体的排放而获得的,这使得三倍体中除了来自父本的遗传物质之外,还包含两套来自母本的存在一定差异的遗传物质,导致其杂合度增高。除此之外,理论上在二倍体中出现的基因型都有可能出现在三倍体中,而三倍体由于多一套染色体可能出现更多的基因型。本研究的三倍体群体中,部分基因型在二倍

体群体中没有出现(表 2),这可能最终导致了三倍体群体较高的期望杂合度。

二倍体牙鲆 21 个位点有 15 个的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数  $d$  为负值,这可视为杂合子缺失,即实际纯合子过量。这主要因为本研究使用的是养殖牙鲆,较少数量的亲本之间近交所致(王伟等, 2004)。但有趣的是,三倍体牙鲆却仅有两个位点的  $d$  为负值,这可能是三倍体含有三套染色体,三条染色体上都是同一个等位基因的概率大大下降,纯合子出现的机会减少,并非其遗传多样性水平高。

此外,二倍体和三倍体群体间的遗传距离为 0.312,由于本研究使用的二倍体和三倍体牙鲆亲本相同,其遗传距离本应较小,而根据群体中各位点等位基因频率计算出的遗传距离相对较大,甚至高于野生和养殖牙鲆群体之间的遗传距离 0.156(王伟等, 2004),这是否与冷休克处理导致等位基因缺失有关,因在冷休克处理过程中,一些对低温不耐受的个体死亡,而对低温较为耐受的个体存活,导致相关等位基因及其频率发生变化,抑或是别的原因尚需进一步研究。

综上所述,本研究用微卫星标记对牙鲆二倍体和三倍体群体的遗传结构和纯合度进行分析,发现两个群体有一定的遗传分化。在三倍体牙鲆群体中,等位基因的缺失造成遗传多样性不升反降。这种遗传多样性的下降是否会对牙鲆三倍体后代的生长及抗逆性能造成影响尚需进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- 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(1): 350-357
- 王磊, 陈松林, 谢明树, 等. 牙鲆三倍体批量化诱导及其生长和性腺发育观察. 水产学报, 2011, 35(8): 1258-1265
- 尤锋, 刘静. 三倍体牙鲆的核型证明. 海洋与湖沼, 1995, 26(5): 115-118
- 田吉腾, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传多样性微卫星分析. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 59-67
- 汪永庆, 王国新, 徐来祥, 等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进. 动物学杂志, 2001, 36(1): 27-29
- 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. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 16-23
- 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究. 水产学报, 1984, 8(4): 343-356
- 蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析. 水产学报, 2010, 34(11): 1629-1635
- 臧坤, 徐永江, 柳学周, 等. 两种养殖条件下牙鲆的血液生理生化指标比较分析. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 36-42
- Alves MJ, Gromicho M, Collares-Pereira MJ, *et al.* Simultaneous production of triploid and haploid eggs by triploid *Squalius alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae). J Exp Zool, Part A: Ecol Genet Physiol, 2004, 301(7): 552-558

- Garnier-Géré PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, *et al.* Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol Ecol*, 2002, 11(8): 1499–1514
- Kazoo T, Shigeaki G, Yoshihiro K. Growth, survival and maturation in the induced triploid hirame *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 1989, 36(4): 267–276
- Kim WJ, Kim KK, Lee JH, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(4): 491–493
- Lampert KP, Lamatsch DK, Epplen JT. Evidence for a monophyletic origin of triploid clones of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Evolution*, 2005, 59(4): 881–889
- Liu Q, Goudie CA, Simco BA, *et al.* Isozyme expression and gene-centromere distances in diploid and triploid hybrid catfish. *Trans Am Fish Soc*, 1996, 125(1): 56–65
- Makino S, Ozima Y. Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of the carp, *Cyprinus carpio*. *Cytologia*, 1943, 13: 55–60
- Maxime V. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish*, 2008, 9(1): 67–78
- Nomura K, Morishima K, Tanaka H, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by half-tetrad analysis using induced triploid families. *Aquaculture*, 2006, 257(1): 53–67
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, *et al.* Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 2009, 293(3): 125–156
- Sekino M, Hara M. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes, Pleuronectoidei, Paralichthyidae). *Mol Ecol*, 2000, 9(12): 2201–2203
- Swarup H. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus*(L). *J Genet*, 1958, 56: 129–141
- Xu T, Chen S. Induction of all-triploid Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by cold shock. *Isr J Aquacult-Bamid*, 2010, 62(1): 43–49
- Wang H, Li F, Xiang J, *et al.* Microsatellite-centromere distances and microsatellite diversity in different ploidy classes of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Genetica*, 2008, 132(1): 43–50

(编辑 冯小花)

## Genetic Diversity Analysis on Artificial Triploid Stock of *Paralichthys olivaceus* using Microsatellite DNA Marker

LIU Hui<sup>1</sup>, WU Zhihao<sup>2</sup>, LI Zhen<sup>1①</sup>, ZHU Xiangping<sup>1</sup>, YOU Feng<sup>2①</sup>, SONG Zongcheng<sup>3</sup>, LI Jun<sup>4</sup>, HU Jinwei<sup>2</sup>

(1. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Weihai Shenghang Aquatic Science and Technology Co., Ltd., Weihai 264200; 4. R & D Center of Marine Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study, we compared the extent of genetic diversity of the triploid and diploid flounders using the microsatellite method. The triploid were induced using cold shock method in 2012, and then they were cultured under the same conditions as their diploid control. Genomic DNAs were isolated using the high salt-extraction method from the muscle tissues of 32 triploid and 32 diploid flounders of 11-month old. The genetic variations of the triploid and diploid flounders were assessed based on the selected 21 microsatellite loci. The PCR products were isolated using 14% PAGE electrophoresis, and the microsatellite alleles were artificially identified and analyzed. The results showed that in the triploid and diploid stocks, the average numbers of alleles per locus ( $A$ ) were 5.6 and 5.0; the total numbers of genotype were 190 and 142; the average numbers of effective alleles per locus ( $a_e$ ) were 3.7 and 2.8; the values of average observed heterozygosity ( $H_o$ ) were 0.613 and 0.868; and the unbiased expected heterozygosity ( $H_E$ ) were 0.681 and 0.629, respectively. The values of the polymorphism information content ( $PIC$ ), the power discrimination ( $DP$ ) and the probability of paternity exclusion ( $PPE$ ) in the triploid and diploid stocks were 0.642 and 0.589, 0.660 and 0.609, 0.482 and 0.399, respectively. The accumulation of  $PIC$  and  $PPE$  both achieved 0.999, which indicated that these microsatellite loci were very sensitive and could be used in the parentage and kinship determination in future genetic breeding studies. The genetic distance ( $D$ ), the genetic similarity ( $I$ ) and the coefficient of gene differentiation ( $G_{ST}$ ) between the triploid and the diploid stocks were 0.312, 0.732 and 0.971 respectively. The genetic diversity of the triploid stock was moderately reduced compared to the diploid stock. There were also some differences in the genotypes between the triploid and diploid flounders.

**Key words** *Paralichthys olivaceus*; Triploid; Artificial induction; Microsatellite DNA marker; Genetic variation

① Corresponding author: LI Zhen, E-mail: zacheryli2012@126.com; YOU Feng, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn