

牙鲆 4 个选择性繁育后代群体遗传结构的微卫星分析

徐田军^{1,2} 陈松林^{1*} 田永胜¹

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 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 生命科学与技术学院, 201306)

摘要 为了检测由 3 个牙鲆基础群体组合交配建立的 4 个选择性繁育后代群体的遗传多样性水平, 本研究利用 10 对微卫星引物分析了其遗传结构信息。计算结果表明, 等位基因数 3~10 个, 平均等位基因数 5.7 个, 有效等位基因数 1.357 1~4.597 9, 平均有效等位基因数 2.983 2, 各个位点的平均观测杂合度 0.208 3~1.000 0, 平均期望杂合度 0.208 1~0.795 6, 多态信息含量 0.167 1~0.750 1, 其中中度多态位点两个, 高度多态位点 7 个, 各群体的多态信息含量从大到小依次为日本亲鱼与抗病亲鱼杂交后代群体、抗病亲鱼自繁后代群体、抗病亲鱼与黄海野生亲鱼繁殖后代群体、日本亲鱼自繁后代群体。分析结果表明, 4 个群体的遗传多态水平均较高, 对 4 个选择性繁育后代群体的平均观测杂合度值进行 X^2 检验表明, 群体间遗传多样性差异不显著。日本亲鱼自繁后代群体与中国海域亲鱼繁育后代群体(抗病亲鱼自繁后代群体和抗病亲鱼与黄海野生亲鱼繁殖后代群体)的遗传距离较远, 分别为 0.272 4 和 0.331 0。根据群体间的遗传距离利用 NJ 法构建系统树, 抗病亲鱼自繁后代群体和抗病亲鱼与黄海野生亲鱼繁殖后代群体聚为一支, 日本亲鱼自繁后代群体和日本亲鱼与抗病亲鱼杂交后代群体聚为一支, 对遗传偏离指数的分析表明群体间的遗传平衡差异很大。

关键词 牙鲆 养殖群体 遗传多样性 微卫星分析

中图分类号 Q959.486; Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0057-07

Genetic structure analysis among four selective offspring stocks of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* by microsatellite markers

XU Tian-jun^{1,2} CHEN Song-lin^{1*} TIAN Yong-sheng¹

(¹Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries, Resource Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Genetic diversity among four selective offspring stocks obtained by mating among three basic populations of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* was assessed using ten microsatellite loci. Results showed that the allele number (A) was 3~10, average allele number was 5.7, effective allele number (A_e) was 1.357 1~4.597 9, average effective allele number was 2.983 2, average observed heterozygosity (H_o) of each locus was 0.208 3~1.000 0, average expected heterozygosity (H_e) of each locus was 0.208 1~0.795 6, average polymorphism information content (PIC) of each locus was 0.167 1~0.7501, and polymorphism infor-

国家 863 计划项目(2006AA10A402)和山东省泰山学者建设工程专项经费共同资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2008-04-08; 接受日期: 2008-09-18

作者简介: 徐田军(1982-), 男, 博士研究生, 主要从事鱼类生物技术研究。E-mail: tianjunxu@163.com, Tel: 15863030825

mation content of JRS, RRS, RYS and JJS followed a decreasing order. Moderate and high genetic diversity was found in JJS and the other three stocks, and X^2 test revealed that there was no significant difference in average observed heterozygosity of the four selective offspring stocks. Genetic distance between JJS and RRS or RYS was comparatively higher than that between RRS and RYS. The genetic distance among the four stocks was used to construct NJ dendrogram via MEGA software. RRS and RYS were within one branch, and JJS and JRS within another branch. Genetic deviation index indicated a difference among stocks. These results indicated that these microsatellite loci selected were very sensitive and could be used in further selective and genetic breeding studies of Japanese flounder.

KEY WORDS *Paralichthys olivaceus* Cultured stocks Genetic diversity
Microsatellite analysis

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 作为我国海水养殖鲆鲽鱼类的主导品种之一,其产值在我国水产业中占有相当大的比重。在我国,牙鲆的养殖依赖于驯化捕捞野生牙鲆作为亲本,产卵孵化鱼苗进行工厂化养殖。而目前国内,牙鲆的鱼苗主要由几个主要的育苗公司来提供,而由于野生亲鱼的减少,亲鱼的补给困难,许多育苗场利用自繁后代留种作为亲鱼,因近亲繁殖而产生一系列的问题:繁殖力下降、遗传多样性降低、抗病力衰退以及白化率升高等。并且随着牙鲆养殖业的快速发展,养殖牙鲆病害频发,给牙鲆生产带来巨大的损失(周丽等 1997)。

微卫星作为一种重要的分子标记被广泛应用于分子标记辅助育种和探讨物种的遗传结构中。对于牙鲆, Sekino 等(2002)利用微卫星和线粒体分析了日本野生群体和养殖群体的遗传信息;在国内一些学者(王伟等 2004;刘云国等 2006;Liu *et al.* 2005)针对不同的养殖和野生群体利用微卫星等分子标记进行了遗传多样性的研究。但由于研究材料的限制,对牙鲆不同群体的杂交和自繁后代的遗传多样性的研究尚未见报道。

杂交和选育是当今鱼类改良的基本手段,通过不同地理群体间的杂交,获得杂交优势能够显著提高生长速度及抗病力等性状。本课题组利用经过自然选择和人工感染选择得到的牙鲆抗病群体(RS)(Zhang *et al.* 2006),引进的日本群体(JS)以及从黄海海域捕捞的野生的牙鲆黄海群体(YS)作为地理群体间杂交育种的基础群体。2007年3月份在山东省海阳市黄海水产有限公司进行牙鲆的不同群体间的杂交和自繁育种(陈松林等 2008)。本研究以4个选择性繁育后代群体作为研究对象,利用微卫星标记分析其遗传结构和多样性,以期为后续的牙鲆育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 交配组合及样本采集

群体1(JJS):日本群体亲鱼自繁后代;群体2(RRS):抗病群体亲鱼自繁后代;群体3(JRS):日本群体×抗病群体杂交后代;群体4(RYS):抗病群体×黄海野生群体繁殖后代。样品均为6月龄鱼,体长为15~18.2 cm,体重为11.1~68.1 g。每组样本为30尾,群体1取自3个全同胞家系,群体2、3、4分别取自5个全同胞家系,剪取鳍条后保存于95%的乙醇中。

1.2 DNA的提取及微卫星分析

DNA提取参照刘云国等(2006)的方法进行。从Sekino等(2002)及Coimbra等(2003)开发的微卫星引物中选择了10条微卫星引物,由上海博尚生物公司合成(表1)。PCR反应体系为15 μ l,包括10 \times buffer 1.5 μ l, 0.2mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L引物,1U的Taq DNA聚合酶(Tiangen)。反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性4 min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火45s, 72 $^{\circ}$ C延伸30s, 35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。反应在PTC-200上进行。

PCR反应结束后,加入等量的甲酰胺变性剂,95℃变性6min,迅速冰浴冷却。变性产物经6%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,银染显色。

表1 10个微卫星引物的序列及退火温度

Table 1 Ten pairs of microsatellite sequence and their specific annealing temperature

微卫星位点 Locus	GenBank 登录号 Accession No.	复性温度(℃) Annealing temperature	重复单元 Repeat motif	引物序列 (5'-3')Primer sequence (5'-3')
Po1	AB046745	60	(TG) ₃ T ₂ (TG) ₈	F-GCCTTTTGTGTCAGCCATTAACAGAGC R-CTGAGGCCAGACATGACATTACCTT
Po13	AB046746	61	(TG) ₃ GA(CA) ₁₃	F-CGGCCTAAACCTGGACATCCTCTCTA R-CGGGACAACGGAGGTTTGACTGAC
Po25A	AB046749	61	(GATG) ₂ A ₂ CA(GATG) ₁₀	F-TGAGGAGTCAGGTTTCAGGCCACT R-TCGCAGGAACACCCAGAGTACAGA
Po26	AB046750	55	(CA) ₆ CGCACGGA(CA) ₇	F-ACACTGGGCCCTCTGTAAACAC R-AGAGGAGAAAGGGCACCGAGATA
Po33	AB046752	57	(TG) ₅ T ₂ (TG) ₁₀	F-GTTGGTTTAACTGATTTCATCTGCAG R-TTACATATCCACAATGCTTCACTC
Po42	AB046754	55	(CA) ₅ (TA) ₁₃ (CA) ₃	F-CGAGCGCTGTTTCAACTACGGTCATT R-ATGATGATCTAACCGTCCGGCTCCAT
Po52	AB046756	56	(CA) ₂ CG(CA) ₆ GA(CA) ₅	F-TCAGACAGAGGAGCGGGTTGTTGC R-GCTGTACCCAGGGTCCGCTGAAGA
Po83	AB046759	55	(CA) ₅ AG(CG) ₂ (TG) ₃ (CG) ₃ (CA) ₁₅	F-TGCGGTCATCATGTCTTTAAAATA R-AGCAAATGTTTGCTTTTGGATACA
Po91	AB046761	60	(CA) ₁₈	F-AGGTTTCAAGGTGTTTCATTGCGAGTC R-TAAAGGAAGTGCCTCACTGTGGAGAA
Poli. 144 TUF	AB086543 AB086544	56		F-CGACACACTCACTGACCTTTTTTGA R-CCTGTGGTGAAGTTTCGATTTGTGT

1.3 数据分析

对照PBR322分子量标准确定每个个体的基因型,利用POPGENE软件计算4个群体的平均等位基因数(A)、平均有效等位基因数(N_e)、最高等位基因频率(F)、低频等位基因数(L)、基因型数(G)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)。同时计算了各群体的遗传相似指数(I)、遗传距离(D)、近交系数(F_{is})、遗传分化指数(F_{st})和基因流(N_m)。并根据Botstein等(1980)的分类方法计算位点多态信息含量(PIC),并进行了Hardy-weinberg遗传偏离指数(d)的计算。利用MEGA3.0软件采用NJ法构建4个群体的系统树。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点的多态性

10个微卫星位点中有9个在4个选择性繁育群体中均显示出了多态性,而Po52位点在JJS群体中仅发现1个等位基因。位点不同,检测到的遗传变异水平也不同(表2)。在10个微卫星位点中共检测到57个等位基因,等位基因最多的是Po83和Po91位点,分别为9和10个等位基因,而Po33和Po52等位基因最少,各为3个等位基因,平均等位基因数5.7个,有效等位基因数为1.3571~4.5979,平均有效等位基因数2.9832,所有位点的有效等位基因数都小于观察到的等位基因数。在所检测的10个微卫星位点中,Po52位点的多态性最低,Po26和Po33位点的多态性也较低,其余7个位点均呈现出较高的多态性。在10个微卫星位点中,平均观测杂合度在0.2083~1.0000之间,而平均期望杂合度在0.2081~0.7956之间。基因型数最少的位点是Po52,4个群体的平均值为2.25,最多的位点是Po83,4个群体的平均值为9。10个位点在4个群体内的平均多态信息含量(PIC)在0.1671~0.7501之间。根据Botstein等(1980)的分类标准,只有Po52位点属于低度多态位点($PIC < 0.25$),Po25和Po33位点属于中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$),而其余7个位点均为高度多态位点($PIC > 0.5$)。

表2 10个微卫星位点在4个牙鲆群体中的分析结果
Table 2 Allelic variability at ten microsatellite loci in Japanese flounder

	微卫星位点 Locus									
	Po1	Po13	Po25A	Po26	Po33	Po42	Po52	Po83	Po91	Po144TUF
JJS										
A	5	3	3	2	2	3	1	4	4	3
A_e	4.295 9	2.691 2	2.198 7	1.303 8	1.997 6	2.073 0	1.000 0	2.531 8	3.995 2	1.774 2
F	0.316 7	0.465 5	0.603 4	0.865 4	0.517 2	0.580 0	1.000 0	0.557 7	0.258 6	0.733 3
L	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
G	5	3	3	2	3	5	1	5	2	4
H_e	0.780 2	0.639 4	0.554 7	0.237 6	0.508 2	0.528 2	0.000 0	0.616 9	0.762 9	0.433 9
H_o	1.000 0	1.000 0	0.793 1	0.269 2	0.620 7	0.640 0	0.000 0	0.730 8	1.000 0	0.200 0
PIC	0.797 1	0.552 8	0.477 0	0.205 8	0.374 7	0.418 9	0.000 0	0.550 0	0.702 8	0.387 9
P	0.000 0**	0.000 1**	0.007 7**	0.466 5	0.224 9	0.653 8		0.267 5	0.000 0**	0.000 0**
d	0.281 7	0.564 0	0.429 8	0.133 0	0.221 4	0.211 7		0.184 6	0.310 8	-0.539 1
RRS										
A	3	7	5	3	3	2	2	7	9	5
A_e	1.699 3	4.891 3	2.798 7	2.126 4	2.486 2	1.917 9	1.991 2	5.496 7	4.685 2	3.278 8
F	0.740 7	0.300 0	0.551 7	0.569 0	0.533 3	0.603 4	0.533 3	0.275 9	0.362 1	0.448 3
L	0	3	0	0	0	0	0	1	2	0
G	5	6	8	5	5	3	3	11	5	9
H_e	0.419 3	0.809 0	0.654 0	0.539 0	0.607 9	0.487 0	0.506 2	0.832 4	0.800 4	0.707 2
H_o	0.296 3	0.933 3	0.517 2	0.379 3	0.566 7	0.241 4	0.466 7	0.827 6	1.000 0	0.620 7
PIC	0.367 5	0.766 0	0.608 5	0.434 0	0.525 8	0.364 1	0.373 9	0.793 8	0.764 4	0.648 5
P	0.107 2	0.0000**	0.001 7**	0.000 1**	0.033 9*	0.005 6**	0.663 3	0.000 3**	0.000 0**	0.032 2*
d	-0.293 3	0.153 6	-0.209 2	-0.296 3	-0.067 8	-0.504 3	-0.078 0	-0.005 8	0.249 4	-0.122 3
JRS										
A	4	6	4	4	3	6	2	6	10	5
A_e	2.885 1	4.583 1	3.076 9	2.893 9	1.948 1	3.515 6	1.033 9	3.887 7	4.620 1	3.364 0
F	0.448 3	0.327 6	0.466 7	0.483 3	0.633 3	0.466 7	0.983 3	0.383 3	0.326 1	0.396 6
L	0	0	0	1	1	2	1	0	5	1
G	5	7	8	6	4	8	2	9	6	7
H_e	0.664 9	0.795 5	0.686 4	0.665 5	0.494 9	0.727 7	0.033 3	0.755 4	0.801 0	0.715 1
H_o	0.965 5	0.965 5	0.666 7	0.700 0	0.600 0	0.633 3	0.033 3	0.900 0	1.000 0	0.413 8
PIC	0.588 3	0.749 6	0.622 5	0.595 7	0.396 5	0.683 5	0.032 3	0.705 0	0.754 7	0.651 2
P	0.000 0**	0.000 0**	0.810 6	0.044 1*	0.100 5	0.000 0**	1.000 0	0.035 4*	0.000 0**	0.000 0**
d	0.452 1	0.213 7	-0.028 7	0.051 8	0.212 4	-0.129 7	0.000 0	0.191 4	0.248 4	-0.421 3
RYS										
A	3	7	4	3	2	5	3	9	8	4
A_e	1.717 6	5.247 8	2.657 2	2.228 2	1.142 1	3.646 5	1.403 3	5.681 8	5.090 9	3.469 0
F	0.733 3	0.250 0	0.517 2	0.604 2	0.933 3	0.357 1	0.833 3	0.300 0	0.321 4	0.392 9
L	0	3	1	0	0	0	1	3	2	0
G	5	6	6	5	2	10	3	11	4	8
H_e	0.424 9	0.823 2	0.634 6	0.562 9	0.126 6	0.739 0	0.292 8	0.840 8	0.818 2	0.724 7
H_o	0.300 0	1.000 0	0.655 2	0.458 3	0.133 3	0.785 7	0.333 3	0.880 0	1.000 0	0.607 1
PIC	0.369 7	0.782 0	0.559 6	0.487 4	0.116 8	0.680 5	0.262 2	0.803 3	0.778 6	0.660 5
P	0.151 6	0.000 0**	0.224 0	0.243 4	0.737 6	0.553 7	0.814 4	0.001 0**	0.000 0**	0.106 1
d	-0.294 0	0.214 8	0.032 5	-0.185 8	0.052 9	0.063 2	0.138 3	0.046 6	0.222 2	-0.162 3
Avg.										
A_e	2.649 5	4.353 4	2.682 9	2.138 1	1.893 5	2.788 3	1.357 1	4.399 5	4.597 9	2.971 5
G	5	5.5	6.25	4.5	3.5	6.5	2.25	9	4.25	7
H_e	0.572 3	0.766 8	0.632 4	0.501 3	0.434 4	0.620 5	0.208 1	0.761 4	0.795 6	0.645 2
H_o	0.640 5	0.974 7	0.658 1	0.451 7	0.480 2	0.575 1	0.208 3	0.834 6	1.000 0	0.460 4
PIC	0.530 7	0.712 6	0.566 9	0.430 7	0.353 5	0.536 8	0.167 1	0.713 0	0.750 1	0.587 0

注:A表示等位基因数目, A_e 表示有效等位基因数,F表示最高频率等位基因的频率,L表示低频等位基因数($f < 0.05$),G表示基因型数, H_e 表示期望杂合度, H_o 表示观测杂合度,PIC表示多态信息含量,P值表示偏离 Hardy-Weinberg 平衡检验,d表示遗传偏离指数

2.2 各群体的遗传多样性及群体遗传分化分析

4 个群体 10 个位点的遗传分化系数(F_{st})及基因流(N_m)见表 3。从表 3 中可以看出在各个群体间存在轻度遗传分化的位点($F_{st} < 0.05$)只有 Po25A,存在中度遗传分化的位点($0.05 < F_{st} < 0.15$)有 7 个,Po42 位点存在高度的遗传分化,而 Po52 遗传分化极高。各个位点的平均遗传分化指数为 0.107 4,说明处于中等遗传分化水平,也表明约 10%的遗传分化来自于群体之间,约 90%的遗传分化来自于群体内。基因流(N_m)越大,表明遗传分化程度越低,因此同样说明 Po25A 位点在各群体间的遗传分化程度最低。

从杂合度的观测值来看,本研究中 4 个繁育后代群体的遗传多样性水平均较高(表 4)。10 个微卫星位点只有在日本亲鱼自繁后代群体(JJS)中包含的多态信息含量较低(0.446 7)。对 4 个群体的期望杂合度(H_e)

和观察杂合度(H_o)进行 X^2 检验,差异均不显著($P=1.0$),说明 4 个群体的遗传多样性指数没有显著差异。

利用 POPGENE 软件计算了群体间的遗传距离和遗传相似度(表 5),从表 5 中可以看出 RYS 群体与 JJS 群体的遗传距离最大为 0.331 0,而 JJS 群体与 JRS 群体遗传距离最小为 0.158 6,另外 JJS 群体与 RRS 群体也存在较大的遗传距离(0.272 4)。根据各群体间的遗传距离,利用 MEGA3.0 软件对 4 个分析群体进行系统聚类分析(图 1)。4 个群体在系统进化树上分为两支,RRS 和 RYS 群体作为一支,JJS 和 JRS 作为一支,JJS 群体在系统树中与其他分支的距离最远。

2.3 Hardy-Weinberg 平衡检验

对 10 个微卫星位点的等位基因频率进行了 Hardy-Weinberg 平衡检验,并计算了各位点在不同群体内的

表 3 10 个微卫星位点在 4 个牙鲆群体间的遗传分化信息

Table 3 Genetic differentiation in ten microsatellite loci among four selective offspring stocks of Japanese flounder

微卫星位点 Locus	近交系数 F_{is}	遗传分化系数 F_{st}	基因流 N_m	微卫星位点 Locus	近交系数 F_{is}	遗传分化系数 F_{st}	基因流 N_m
Po1	-0.138 6	0.109 5	2.032 3	Po42	0.056 2	0.165 6	1.260 1
Po13	-0.293 1	0.073 6	3.145 5	Po52	-0.018 8	0.256 5	0.724 7
Po25A	-0.058 6	0.022 3	10.959 6	Po83	-0.116 6	0.093 9	2.411 9
Po26	0.082 0	0.082 7	2.773 6	Po91	-0.280 7	0.068 9	3.380 4
Po33	-0.124 3	0.124 8	1.753 0	Poli144TUF	0.273 8	0.076 4	3.022 3
Avg.	-0.061 9	0.107 4	3.146 3				

表 4 牙鲆 4 个选择繁育后代群体在 10 个微卫星基因座上的平均等位基因数(A)、有效等位基因数(A_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)以及多态信息含量(PIC)

Table 4 Average number of alleles (A), number of effective alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) in 10 loci among 4 selective breeding stocks of Japanese flounder

Stocks	A	A_e	H_o	H_e	PIC
JJS	3	2.386 1	0.625 4	0.506 2	0.446 7
RRS	4.6	3.137 2	0.584 9	0.636 2	0.564 7
JRS	5	3.180 8	0.687 8	0.634 0	0.577 9
RYS	4.8	3.228 4	0.615 3	0.598 8	0.550 0

表 5 4 个选择性繁育群体的遗传距离及相似性指数

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance in 4 selective offspring stocks of Japanese flounder

	JJS	RRS	JRS	RYS
JJS		0.761 5	0.853 3	0.718 2
RRS	0.272 4		0.829 3	0.826 4
JRS	0.158 6	0.187 2		0.843 3
RYS	0.331 0	0.190 7	0.170 4	

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为遗传相似性指数

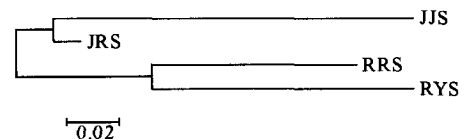


图 1 采用 NJ 法构建的 4 个牙鲆群体的系统树
Fig. 1 NJ dendrogram showing the polygenetic relationship among four stocks of flounder

4 个群体在系统进化树上分为两支,RRS 和 RYS 群体作为一支,JJS 和 JRS 作为一支,JJS 群体在系统树中与其他分支的距离最远。

遗传偏离指数(d)。从表1中可以看出,4个牙鲆群体中,RYS群体中有3个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡,而在 JJS、RRS 和 JRS 群体中分别有 5,8 和 7 个位点偏离 HW 平衡,偏离平衡的位点较多,这一结果与刘海金等(2008)研究的结果一致。HW 遗传偏离指数(d)反映了 H_o 和 H_e 之间的平衡关系。本研究中 d 值变化较大,从 -0.539 1 到 0.564 0。在各个群体均表现出杂合子缺失的位点,在 JJS 群体中分别有 1 个位点出现杂合子缺失,在 JRS 和 RYS 群体中各有 3 个位点杂合子缺失,而在 RRS 群体中有 8 个位点杂合子缺失,其中 Po1144TUF 位点在 4 个群体中均表现出杂合子缺失。群体间的杂合子缺失和过剩存在很大的差异。

3 讨论

微卫星具有等位基因数目多、多态性高、共显性以及孟德尔遗传方式等特点,它作为一种优异的分子标记广泛应用于揭示各种物种的遗传多样性、构建连锁图谱和 QTL 定位辅助育种等研究工作。因此,目前在水产动物的分子标记研究中首选的就是微卫星标记。刘云国等(2005、2006)利用 10 个微卫星位点分析了牙鲆 3 个选择性养殖群体的遗传多样性;王伟等(2004)利用 10 个微卫星位点分析了山东近海牙鲆自然和养殖群体的遗传多样性。另外刘海金等(2008)利用 16 个微卫星位点分析了牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性,探讨了各群体的遗传分化及亲缘关系。遗传多样性的高低对繁育能力、抗病抗逆和生长等性状有很大的影响,特别是亲本群体和预留做种的鱼苗,必须保证一定的遗传多态水平,才能在自然交配和家系建立中维持较远的遗传距离和较大的遗传差异。本研究首次利用牙鲆 3 个基础群体进行群体内自繁和群体间的杂交,以 4 个选择性繁育后代群体作为研究材料,分析了各个群体的遗传多样性水平,探讨了群体间的遗传分化水平和亲缘关系,研究结论有助于进一步的牙鲆育种工作,根据繁育后代群体的遗传结构来判断后代的遗传多样性指数,以确定是否适合进一步的留种和选育工作。

在本研究中所采用的 10 个微卫星位点中,仅有 Po52、Po26 和 Po33 位点多态水平较低,其余 7 个位点在 4 个群体中均表现出高度多态($PIC > 0.5$)。因此这些位点可以用于后续的牙鲆遗传信息分析。10 个微卫星位点在 4 个群体中有 7 个位点处于中度遗传分化水平,0.107 4 的平均遗传分化指数表明遗传分化约有 90% 来自群体内,约 10% 来自于群体间。杂合度是表征群体遗传多样性的一个重要的指标,理论上在没有近交选择和外来因素影响的前提下,观测杂合度趋向于接近期望杂合度。本研究发现 4 个选择繁育后代群体的观测杂合度水平均较高,说明 4 个群体的遗传多样性水平均较高。从表 4 中可以看出 JJS 群体的平均等位基因数(A)、有效等位基因数(A_e)、期望杂合度(H_e)以及多态信息含量(PIC)均低于其他 3 个群体,但观测杂合度(H_o)也达到了 0.625 4。在 4 个群体中,10 个微卫星位点的 PIC 值由大到小分别为 JRS、RYS、RRS 和 JJS, H_e 值由大到小分别为 JRS、RYS、JJS 和 RRS,从中可以看到,JRS 多态性水平最高,极有可能是由于两个地理群体的杂交造成的后代群体的高度遗传多态性,RYS 群体多态性水平较高可能是由于黄海野生捕捞群体的高度遗传多态遗传给后代,虽然与之交配群体同是中国海域的抗病选育群体,但是由于野生遗传资源的优势,后代仍然呈现了较高的遗传多态水平。JJS 和 RRS 两个群体较低的遗传多态水平在很大程度上应该归因于同一地理海域的群体内交配,近缘亲本的交配以及缺少外来基因的渗入造成了这两个群体的稍低的遗传多态。同时 JJS 群体的 PIC 值要低于其他 3 个群体,可能是由于引进的日本亲鱼已经经过较高强度的选择,虽然生长性能较好,但其遗传背景比较窄,遗传差异不大,同时也可能是由于日本亲鱼基础群体的数量较少所致。Sekino 等(2002)利用 11 个微卫星标记对日本的 3 个养殖群体进行分析,其杂合度为 0.59~0.71,刘海金等(2008)利用 16 个微卫星位点分析了 5 个养殖群体,其观测杂合度为 0.506 3~0.635 4, PIC 值为 0.527 4~0.597 1。本研究采用 10 个微卫星位点分析的 4 个群体的观测杂合度为 0.584 9~0.687 8, PIC 值为 0.446 7~0.577 9,与刘海金等(2008)研究结果相比,遗传多态性差异不大,但与王伟等(2004)发现养殖群体的杂合度为 0.731 0 相比要低,可能与采用的微卫星位点的多态性程度差异有关,也可能与其采集的样本遗传基础比较广泛所致。本研究发现 4 群体的遗传多样性均处于较高的遗传多态水平,可以考虑进一步的选择留种以及家系选育工作。

从 4 个群体间的遗传距离和遗传相似性指数看,JJS 群体与中国海域亲鱼繁育后代群体(RRS 和 RYS)的遗传距离较远,分别为 0.272 4 和 0.331 0,而与存在日本亲鱼遗传信息的 JRS 群体的遗传距离仅 0.158 6,与

遗传距离成负相关的相似性指数也体现了这一结果。中国海域亲鱼交配产生的繁育群体(RRS和RYS)之间的遗传距离较小。从系统树上也可以看出RRS和RYS首先聚成一支,而后亲缘关系较近的为JRS杂交群体,JJS群体则与RRS和RYS群体亲缘关系最远,只有与存在共同遗传背景的JRS群体才聚在一支。上面这些结果都说明了不同地理种群的牙鲆具有较大的遗传差异,遗传距离较远,而杂交优势的体现正是利用了具有差异较大遗传背景的亲本交配以产生杂种优势。

10个微卫星位点在4个群体中的平均遗传分化系数(F_{st})为0.1074,按照一般评判标准属于中等分化,刘海金等(2008)分析的5个养殖群体的平均遗传分化系数为0.0991,You等(2002)利用RAPD技术发现山东野生群体与养殖群体的遗传分化系数为0.119,本研究结果与其他学者的研究结果类似,说明牙鲆不同群体间的遗传分化和遗传变异的程度是比较接近的。

选择留种和培育亲本必须保存较高的遗传多态,因此在选择亲本及评价群体的遗传结构时需要对其遗传多样性和遗传距离等信息利用分子标记进行评测。微卫星分析结果表明,本研究选择的4个选择性繁育后代群体遗传多态水平较高,此研究结果反映了4个选择性繁育后代群体的遗传多样性比较丰富,适合在这些群体中进行进一步的选择育种,同时在选育中还要考虑到不同地理群体交配产生的杂种优势效应。

参 考 文 献

- 王 伟, 尤 锋, 高天翔, 张培军. 2004. 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, 35(6):530~537
- 刘云国, 陈松林, 李八方, 汪东风. 2006. 牙鲆选择性养殖群体遗传结构的微卫星分析. 高技术通讯, 18(1): 94~99
- 刘海金, 朱晓琛, 孙效文, 杨立更, 薛玲玲, 毛连菊. 2008. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析. 中国水产科学, 15(1): 30~37
- 周 丽, 宫庆礼, 俞开康. 1997. 牙鲆的疾病. 青岛海洋大学学报, 27(2): 173~180
- 陈松林, 田永胜, 徐田军, 刘寿堂, 刘本伟, 于过才, 邓 寒. 2008. 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. 水产学报, 32(5):665~673
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. *et al.* 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32:314~331
- Coimbra, M. R. M., Kobayashi, K., Koretsugu, S. *et al.* 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220:203~218
- Liu, Y. G., Chen, S. L., and Li, B. F. 2005. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture*, 243:103~111
- Sekino, M., Hara, M., and Taniguchi, N. 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 213:101~122
- You, F., Xiang, J. H., Song, L. S. *et al.* 2002. Genetic variations in natural and cultured stocks of Shandong *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) as revealed by RAPD. *Studia Marina Sinica*, 44:228~234
- Zhang, Y. X., Chen, S. L., Liu, Y. G., Sha Z. X., and Liu, Z. J. 2006. Major histocompatibility complex IIB allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Marine Biotechnology*, 8:600~610