

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)真、伪雄鱼群体表型和遗传性状分析*

李洪^{1,2} 田永胜^{1,4} 李祥孔^{1,3} 陈张帆¹ 宋莉妮^{1,2} 段会敏^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 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. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023;
4. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)养殖群体中存在真雄鱼(ZZ)和伪雄鱼(ZW)现象,进行表型和遗传特征研究对其育种及优良苗种培育具有重要的意义。本研究以半滑舌鲷真、伪雄鱼群体及母系半同胞家系为研究对象,首先测定了性成熟半滑舌鲷的真、伪雄鱼群体的表型性状,对其性状进行了比较分析。结果显示,性成熟半滑舌鲷真、伪雄鱼的体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距和眼径 7 个表型性状都存在极显著差异($P < 0.01$),伪雄鱼的生长速度比真雄鱼快。利用半滑舌鲷 22 对多态性微卫星标记,对 2 组半滑舌鲷真、伪雄鱼半同胞家系群体进行了遗传多样性分析。筛选出的 22 对引物扩增产物均具有多态性,4 个半同胞家系群体中共检测到 232 个等位基因,群体平均等位基因数(N_a)均大于平均有效等位基因数(N_e);平均观测杂合度(H_o)均小于平均期望杂合度(H_e);平均多态信息含量(PIC)分别为 0.4566、0.4254、0.5069、0.4795。22 个多态性位点在 4 个半同胞家系群体中分别有 3、3、4 和 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。4 个半同胞家系群体间的 Nei's 遗传距离为 0.2101–0.5840,遗传相似性系数为 0.5577–0.8105。本研究表明,半滑舌鲷真、伪雄鱼在生长性状上存在明显差异,同母系的真、伪雄鱼半同胞家系群体间的遗传相似系数较高,遗传距离较小,遗传多样性指标相近。

关键词 半滑舌鲷;真雄鱼;伪雄鱼;表型性状;微卫星标记;遗传多样性

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0062-08

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的性别决定机制为 ZW/ZZ 型(周丽青等, 2005),即雌性染色体核型为 ZW,雄性核型为 ZZ。半滑舌鲷还存在天然性逆转现象,ZW 雌性转化为生理雄性,即为伪雄鱼,性逆转的伪雄鱼(ZW)与正常雌鱼(ZW)交配会得到 75% 的雌性个体和 25% 的雄性个体(Chen *et al*, 2008)。同时,伪雄鱼后代中的雌性个体更易转化为伪雄鱼(陈松林等, 2013)。半滑舌鲷雌鱼生长速度是雄鱼的 4–6 倍,而养殖群体中雄性率可达 70%,雄鱼生长速度过慢会

导致半滑舌鲷养殖效益降低(Chen *et al*, 2009)。因此,开展养殖群体中半滑舌鲷真、伪雄鱼遗传性别鉴别及其后代性状的遗传评估具有重要的意义。

微卫星(Simple sequence repeat, SSR)是近年来发展迅速、应用广泛的分子标记之一,已被广泛应用于群体遗传结构分析、亲子鉴定、遗传图谱构建、QTL 定位等方面(Ferguson, 1994; Kocher *et al*, 1998; Daemen *et al*, 2001)。在半滑舌鲷群体遗传研究方面,常建波等(2011)利用微卫星标记对半滑舌鲷 4 个群体

* 国家自然科学基金项目(31372510)资助[This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31372510)]. 李洪, E-mail: 354294982@qq.com

① 通讯作者: 田永胜, 研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-04, 收修改稿日期: 2016-04-11

的遗传结构进行了分析,徐营等(2011)利用24对微卫星标记对半滑舌鲷的养殖群体和减数分裂雌核发育群体的遗传多样性进行了分析。此外,王美玉等(2012)通过检测半滑舌鲷半同胞家系的极端大群体和极端小群体,筛选出12个与全长、体高、体重相关的微卫星位点。但目前有关半滑舌鲷真、伪雄鱼的表型性状差异及其半同胞家系群体的遗传多样性未见报道。为此,本研究对半滑舌鲷性成熟真、伪雄鱼的表型性状进行了差异比较,同时以半滑舌鲷性成熟的雌鱼和真、伪雄鱼为材料建立真、伪雄鱼母系半同胞家系,采用微卫星标记对真、伪雄鱼半同胞家系群体的遗传结构进行了分析,为半滑舌鲷真、伪雄鱼种质资源分析以及半滑舌鲷选择育种提供一定的参考资料。

1 材料与方法

1.1 半滑舌鲷真、伪雄鱼群体的表型性状测定

实验所用性成熟半滑舌鲷亲鱼由山东海阳水产有限公司提供。实验测定了相同养殖条件下、同一池塘且相同孵化时间的2龄半滑舌鲷真雄鱼(20尾)与伪雄鱼(12尾)的体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距、眼径、背鳍条数、腹鳍条数和臀鳍条数10个表型性状,其真、伪雄鱼的遗传性别采用半滑舌鲷微卫星标记CseF382进行鉴定(Chen *et al.*, 2007)。

1.2 半滑舌鲷真、伪雄鱼半同胞家系的建立和培育

利用1.1中筛选出的真、伪雄鱼进行家系的建立,从半滑舌鲷亲鱼中选取2尾3+龄性成熟雌性个体(ZW♀)为母本,分别以2尾正常雄鱼(ZZ♂)和2尾伪雄鱼(ZW♂)为父本,分别建立2组母系半同胞家系。第1组半同胞家系是108号和109号家系,108为正常雌鱼(ZW♀)×伪雄鱼(ZW♂)家系,109为正常雌鱼(ZW♀)×正常雄鱼(ZZ♂)家系;第2组半同胞家系是113号和114号家系,113为正常雌鱼(ZW♀)×伪雄鱼(ZW♂)家系,114为正常雌鱼(ZW♀)×正常雄鱼(ZZ♂)家系。2组母系半同胞家系子代在相同养殖条件下不同池塘中养殖培育。

1.3 样本采集和DNA提取

当家系鱼苗生长到60 d时,分别从4个半同胞家系采集30个个体肌肉样本,分别置于1.5 ml离心管中,加入无水乙醇,-20℃长期保存,用于提取DNA。

采用标准酚-氯仿-异戊醇-酒精法提取基因组DNA(Sambrook *et al.*, 1989)。1%的琼脂糖凝胶电泳和

核酸蛋白酶标仪检测提取DNA的质量和浓度,并将DNA浓度调整至50 ng/μl,-20℃保存备用。

1.4 微卫星引物和PCR反应

参照半滑舌鲷遗传连锁图谱(Liao *et al.*, 2009; Sha *et al.*, 2011),在每个连锁群上各选取2-3个标记,21个连锁群上共选取微卫星标记50个,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成相应引物。实验所用试剂10×Taq buffer、dNTPs、Taq酶、DL2000 DNA Marker以及PBR 322/Msp I DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司。

利用合成的50对引物对4个半同胞家系群体各22个个体的基因组DNA进行PCR扩增,通过扩增出的目的条带多态性检测出其中22对引物具有多态性(表1)。PCR反应总体积(16 μl):10×Taq buffer 1.6 μl, dNTPs (2 mmol/L) 0.8 μl,模板DNA 1.1 μl,上下游引物(10 μmol/L)各0.6 μl, Taq酶(1 U) 0.15 μl,加灭菌水至16 μl。PCR扩增反应程序:95℃预变性5 min; 95℃ 30 s, 55-61℃ 30 s, 72℃ 30 s,共40个循环; 72℃延伸7 min, 4℃保存。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和基因分型

将PCR扩增产物进行6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳结束后参考Caetano-Anolles等(1997)报道的银染法对电泳凝胶进行染色,用相机照相保存,并记录基因型。

1.6 数据分析

用SPSS 19.0软件对半滑舌鲷真、伪雄鱼的表型性状采用独立样本 t 检验方法进行差异显著性分析。根据PCR扩增条带获得的基因型,利用POPGEN32(Nei, 1978)和PIC-cal0.6(张涛等, 2009)软件进行统计分析。计算各家系群体内的平均等位基因数(Number of allele, N_a)、平均有效等位基因数(Effective number of allele, N_e)、平均观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、平均期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量(Polymorphism information content, PIC),以及群体间的遗传分化指数(F -statistics, F_{st})、Nei氏遗传距离和遗传相似性,对各微卫星位点在每个家系群体中的哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)进行检验。Bonferroni校正法(Rice, 1989)对HWE检验 P 值进行校正。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。

表1 22对多态性微卫星引物信息
Tab.1 Information of twenty-two primer pairs of microsatellite markers

| 连锁群 Linkage | 标记名称 Microsatellite marker name | 退火温度 Annealing temperature (°C) | 正向引物 Forward primer | 反向引物 Reverse primer |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 2 | scaffold2104_64144 | 61 | GGTTTGAAGTGATCTCTCAGTCTGG | ACGGCTCCTCCATTAATTACAGC |
| 4 | scaffold365_18009 | 55 | TGTGGAATAAAAATATAAATACACCGC | TATGGACATTTATGTTTCATGCGA |
| 5 | scaffold170_8353 | 59 | CACACGGGAAGTCACTATTCTTCA | CACTGAGGATGGATTTAGGCAGAT |
| 6 | scaffold3321_70434 | 59 | TGAAGAAGCTTCAGTTGACAAACG | GGACTGAGCTGAAAATGTCTGTT |
| 8 | scaffold767_34395 | 61 | TTCAACTCCAGAAGATGTGCAGAC | AAACCTCTCTGATCCACCAGTACG |
| 11 | scaffold2585_68067 | 62 | AGGGAGGAAGGCTAGTGAGAAGAG | AAGTGTAAGCCAAGGGGGTAAAG |
| 11 | scaffold1143_45424 | 60 | CCTGCTTCATGGTGTCTTAGACT | GAACCTCGAGAATCACTGATCAACAA |
| 12 | scaffold3931_70955 | 59 | CTGATTTGGATTGACAGACGACAC | ACGACACTTTATGACGGCGTTTAT |
| 14 | scaffold224_10839 | 59 | TCTGTGTGGGGTAAAATTGGAGTT | AGAGATGTATTCATGGCAGCAGGT |
| 15 | scaffold709_32811 | 59 | GAAGAGAAGGATGCAACAAGAGGA | GCTGGATAGCAGGCATGTCTTAAT |
| 18 | scaffold414_19940 | 60 | GGCTGTAAATCTGGTTCACAGCACT | CAGATAATTGGTCCCCTGAAAACC |
| 4 | scaffold079499 | 58 | CTTCTCCTGATGGAAGGTTCTGA | ACCTGCAGCCTCCTATCATC |
| 18 | scaffold1054_43419 | 59 | CAGCAGTAGGTTGTTTGTCTTTGC | GGAGACACTTTGATGGATGGATCT |
| 12 | scaffold1785_59319 | 59 | GTGAGTGTGTTGTGTTTGGAAAGC | TTCACATTCCTCCCTTTACTCGTC |
| 11 | scaffold426_14789 | 60 | GCTTGACTTTAGGGCGAGG | AAGATGACGGATGGATGGTTCA |
| 9 | scaffold363_12291 | 58 | GTTCTGGGTTAAAGGGTTGG | TGACTGCACTGATGGATAAGCA |
| 18 | scaffold4451_1100 | 60 | CTGACGACCAGAGAACAGA | CTGTTGGACGTCATTGAACAT |
| 19 | scaffold1170_46055 | 60 | CCCAGAAATGAGACAAGACGAGAT | TGTCCTCCGAGATGAGAGACAAG |
| 19 | scaffold2495_67575 | 60 | TTCTCCATCGAAGATTGGCTTTAG | GAGGGAGAGGTTTGTCTGGATAAGT |
| 20 | scaffold2841_69827 | 60 | GCAATGTTACTACAGTGCTCTGGGA | TTGCAGTCAATGTGAAAACAGTCA |
| 20 | scaffold1797_59428 | 60 | GCGATTAATGATAATCCGCCATA | GAGTGTCTGTTAGGACGATGTCTG |
| 6 | scaffold954_39899 | 59 | TGAGGAGCAGGTTGTTGATGTAAA | CCTTGATCCTGAGTGAGATGATGA |

2 结果

2.1 半滑舌鲷真、伪雄鱼表型性状分析

半滑舌鲷真、伪雄鱼表型性状的差异分析结果见表2,半滑舌鲷真、伪雄鱼的体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距和眼径7个表型性状存在极显著差异($P < 0.01$),显著性的差异性状占15个表型性状的46.67%;背鳍条数、腹鳍条数和臀鳍条数3个表型性状以及全长/体长、体长/头长、体长/体宽、体长/眼间距和眼间距/眼径5个比例性状差异不显著($P > 0.05$)。对7个表型性状的差异比较显示,半滑舌鲷伪雄鱼的生长速度快于真雄鱼,但真、伪雄鱼间的比例性状无显著差异(表2)。

2.2 微卫星扩增图谱

在22对多态性引物扩增结果中,引物 scaffold-079499 在4个半同胞家系群体中的扩增结果见图1。从图1可以看出,相同引物伪雄鱼个体扩增出的目的条带多态性高于真雄鱼。

2.3 4个家系群体的遗传多样性与分化

根据PCR扩增条带获得的基因型,对4个家系群体的遗传多样性进行分析。结果如表3所示,4个半同胞家系群体的平均有效等位基因数(N_e)为2.2524–2.4714,平均观测杂合度(H_o)为0.2690–0.3160,平均期望杂合度(H_e)为0.5040–0.5467,平均多态信息含量(PIC)为0.4254–0.5069;Shannon's信息指数 I 为0.8040–0.8789,从表3可看出,108与109、113与114号家系间的各遗传多样性指标彼此相近。

对22个微卫星位点在不同家系群体中的HWE进行了检验。分析发现,在108和109、113和114家系群体中分别有3和3、4和5个微卫星位点显著偏离HWE;整体上,在4个半同胞家系群体中,除scaffold2104_64144、scaffold365_18009、scaffold3321_70434、scaffold767_34395、scaffold4451_1100、scaffold2495_67575、scaffold2841_69827、scaffold1797_59428符合HWE外,其他14个位点均偏离HWE(表4),连锁不平衡检测表明,22个多态性位点之间不存在连锁不平

表 2 半滑舌鲷真、伪雄鱼表型性状的比较
Tab.2 Comparison of phenotypic traits between ZZ males and ZW males of *C. semilaevis*

| 性状 Traits | 平均值±标准差(Mean±SD) | | 变化范围 Variation range | |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|-------------|
| | 伪雄鱼 ZW | 真雄鱼 ZZ | 伪雄鱼 ZW | 真雄鱼 ZZ |
| 体重 Body weight (g) | 427.85±133.01 ^a | 278.47±51.47 ^b | 274.4–748.0 | 189.2–360.8 |
| 全长 Full length (cm) | 41.80±4.60 ^a | 36.20±2.00 ^b | 32.8–49.8 | 33.4–40.1 |
| 体长 Body length (cm) | 40.53±4.40 ^a | 34.67±1.79 ^b | 32.2–48.1 | 32.0–38.6 |
| 体宽 Body width (cm) | 10.58±1.00 ^a | 8.77±0.56 ^b | 9.0–12.7 | 7.7–9.8 |
| 头长 Head length (cm) | 8.49±0.67 ^a | 7.06±0.39 ^b | 7.0–9.4 | 6.5–7.8 |
| 眼间距 Eye spacing (cm) | 0.48±0.07 ^a | 0.42±0.04 ^b | 0.4–0.6 | 0.4–0.5 |
| 眼径 Eye diameter (cm) | 0.58±0.05 ^a | 0.50±0.00 ^b | 0.5–0.6 | 0.5–0.5 |
| 背鳍条数 Dorsal fin ray number | 125.50±10.80 | 125.80±8.30 | 114.0–145.0 | 111.0–144.0 |
| 腹鳍条数 Pelvic fin ray number | 3.90±0.30 | 3.80±0.90 | 3.0–4.0 | 4.0–4.0 |
| 臀鳍条数 Anal fin ray number | 101.90±17.20 | 109.30±15.20 | 79.0–126.0 | 88.0–130.0 |
| 全长/体长 Full length/Body length | 1.03±0.03 | 1.04±0.01 | 1.0–1.1 | 1.0–1.1 |
| 体长/体宽 Body length/Body width | 3.83±0.28 | 3.96±0.22 | 4.3–5.2 | 4.6–5.2 |
| 体长/头长 Body length/Head length | 4.77±0.27 | 4.92±0.19 | 3.3–4.2 | 3.6–4.4 |
| 体长/眼间距 Body length/Eye spacing | 84.70±9.22 | 84.05±7.51 | 67.8–100.5 | 64.6–96.5 |
| 眼间距/眼径 Eye spacing/Eye diameter | 0.85±0.14 | 0.83±0.07 | 0.7–1.2 | 0.8–1.0 |

注: 不同字母表示差异极显著($P<0.01$)

Note: Different letters represented highly significant difference ($P<0.01$)

衡现象。

对 4 个半同胞家系群体两两之间在 22 个多态性位点的群体分化指数进行了计算(表 5), 22 个微卫星位点计算的 2 组同母系半同胞家系间的遗传分化指数(F_{st})平均值分别为 0.1211 和 0.0782; 不同母系家系间的 F_{st} 平均值在 0.1448–0.1737 之间, 这表明同母系的半同胞家系间的遗传分化程度低于不同母系家

系间的遗传分化程度。

表 3 4 个半滑舌鲷家系群体基于 22 个微卫星位点的遗传多样性指标

Tab.3 Genetic diversity indices for four family populations of *C. semilaevis* as revealed by twenty-two microsatellite loci

| 家系群体 Family populations | N_a | N_e | H_o | H_e | PIC | I |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 108 | 2.5909 | 2.2524 | 0.3160 | 0.5172 | 0.4566 | 0.8220 |
| 109 | 2.5455 | 2.2766 | 0.3699 | 0.5040 | 0.4254 | 0.8040 |
| 113 | 2.7727 | 2.4714 | 0.2810 | 0.5323 | 0.5069 | 0.8789 |
| 114 | 2.6818 | 2.3952 | 0.2690 | 0.5467 | 0.4795 | 0.8691 |

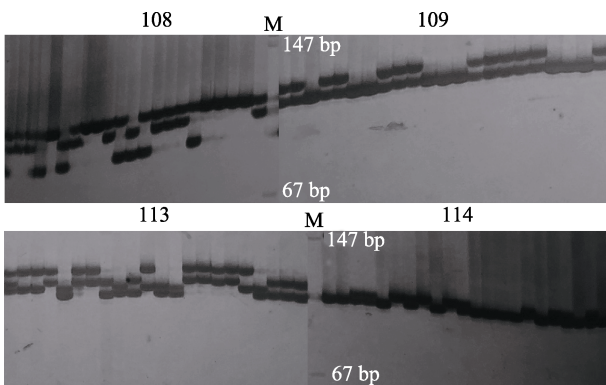


图 1 引物 scaffold079499 在 4 个半同胞家系群体中的扩增结果

Fig.1 The bands amplified by primer scaffold079499 in four half-sib family populations

M: PBR 322/Msp I DNA 分子量标准; 108、113: 伪雄鱼家系群体; 109、114: 真雄鱼家系群体

M: PBR 322/Msp I DNA Marker; 108, 113: ZW male family groups; 109, 114: ZZ male family populations

2.4 4 个家系群体间的遗传距离和遗传相似性系数

半同胞家系 108 与 109、113 与 114 间的遗传距离分别为 0.3215、0.2101, 低于 108 与 113、114 以及 109 与 113、114 家系群体间的遗传距离(0.4261–0.5840), 而半同胞家系 108 与 109、113 与 114 间的遗传相似性系数分别为 0.7250、0.8105, 高于 108 与 113、114 以及 109 与 113、114 家系群体间的遗传相似性系数(0.5577–0.6530)(表 6), 表明同母的半滑舌鲷真伪雄鱼半同胞家系间存在较低的遗传距离和较高的遗传相似度。

表 4 4 个半滑舌鲷家系群体中 22 个微卫星位点的哈迪-温伯格平衡检验
Tab.4 The probability of Hardy-Weinberg equilibrium of 22 microsatellite loci
between four family populations of *C. semilaevis*

| 微卫星位点 Microsatellite loci | 哈迪-温伯格平衡检验 P 值 Hardy-Weinberg equilibrium (P) | | | | |
|---------------------------|---|---------|---------|---------|---------|
| | 108 | 109 | 113 | 114 | Total |
| scaffold2104_64144 | 0.0048 | 0.3340 | 0.0018 | 0.3395 | 0.0241 |
| scaffold365_18009 | 0.2762 | 0.0642 | 0.0926 | 0.1362 | 0.0379 |
| scaffold170_8353 | 0.0018 | 0.0946 | 0.7509 | 0.1391 | 0.0000* |
| scaffold3321_70434 | 0.2138 | 0.0933 | 0.0946 | 0.0001* | 0.0005 |
| scaffold767_34395 | 0.1391 | 0.0010 | 0.1943 | 0.0946 | 0.1043 |
| scaffold2585_68067 | 0.1391 | 0.0001* | 0.0001* | 0.0361 | 0.0000* |
| scaffold1143_45424 | / | 0.3847 | 0.5945 | 0.0815 | 0.0000* |
| scaffold3931_70955 | 0.2632 | 0.0309 | / | 0.0309 | 0.0000* |
| scaffold224_10839 | 0.0098 | 0.8473 | 0.0292 | 0.0192 | 0.0004* |
| scaffold709_32811 | 0.0427 | 0.2153 | 0.0037 | 0.0002* | 0.0000* |
| scaffold414_19940 | 0.0003* | 0.0020 | 0.2153 | 0.0048 | 0.0000* |
| scaffold079499 | 0.2153 | 0.0620 | 0.0001* | 0.0000* | 0.0001* |
| scaffold1054_43419 | 0.4605 | 0.0861 | / | 0.0148 | 0.0000* |
| scaffold1785_59319 | 0.0605 | / | 0.0011 | 0.0355 | 0.0000* |
| scaffold426_14789 | 0.0001* | 0.0000* | 0.0427 | 0.0043 | 0.0000* |
| scaffold363_12291 | 0.0129 | 0.0018 | 0.0001* | 0.0000* | 0.0000* |
| scaffold4451_1100 | 0.5048 | 0.0605 | 0.0016 | 0.1391 | 0.0163 |
| scaffold1170_46055 | 0.0000* | / | 0.0001 | 0.0001* | 0.0000* |
| scaffold2495_67575 | 0.0438 | 0.1391 | 0.0605 | 0.0168 | 0.6410 |
| scaffold2841_69827 | 0.2213 | 0.0882 | 0.2278 | 0.4502 | 0.1511 |
| scaffold1797_59428 | 0.2597 | 0.0001* | 0.1043 | 0.0007 | 0.0022 |
| scaffold954_39899 | 0.6706 | 0.0430 | 0.4158 | / | 0.0000* |

“/”表示单态位点；*表示经过 Bonferroni 校正后显著偏离 HWE ($\alpha=0.05$)

“/” indicated a monomorphic locus; * indicated significant deviation from HWE after Bonferroni correction ($\alpha=0.05$)

3 讨论

半滑舌鲷养殖群体中,发现有一定数量的伪雄鱼(即遗传性别为雌性,生理性别为雄性)(季相山等,2010),这表明半滑舌鲷养殖群体中有两种雄鱼:一种为真雄鱼,另一种为伪雄鱼,伪雄鱼的存在大大降低了半滑舌鲷养殖群体中的雌性比例,进而对半滑舌鲷养殖生产产生不良影响。早前有报道指出,温度能够影响半滑舌鲷性别控制和性别分化机制(邓思平等,2007);之后,半滑舌鲷人工诱导雌核发育技术获得了成功(Chen *et al*, 2009),并筛选出了其遗传性别鉴定微卫星标记 CseF783(马洪雨等,2009),这说明半滑舌鲷在其性别控制、性别标记的筛选与应用等方面的研究已有一定进展,但目前还无法从遗传上控制养殖群体中雄鱼数量太多造成的生产效益低下的现象,因此,开展半滑舌鲷真、伪雄鱼生物学及遗传性状的研究具有重要意义。

表型性状是判断一个物种或品种区别于其他品种最直观的特征,对于鱼类育种群体的筛选和应用可提供直观信息。本研究对生长期相同的 2 龄半滑舌鲷

真、伪雄鱼群体 15 个生物学性状进行测量和比较分析,发现真、伪雄鱼的比例性状之间无显著性差异,这说明半滑舌鲷真、伪雄鱼的体型相似;而伪雄鱼体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距和眼径 7 个性状的平均值显著大于真雄鱼,这为半滑舌鲷真、伪雄鱼的直观判别与筛选提供了可靠的表型性状。

遗传多样性是鱼类生物多样性的的重要组成部分,它是衡量生物所携带遗传信息的变异程度,而 DNA 是遗传信息的载体,所以 DNA 的变化可直接反映物种遗传变异程度。微卫星标记是研究群体遗传多样性的有效标记(林能峰等,2008),一般用有效等位基因数、杂合度及多态信息含量等指标来衡量遗传标记的多态性程度及其应用价值(吴旭东等,2011),其中,杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数(Valizadeh *et al*, 1996),它可以反映群体遗传多样性高低,平均期望杂合度值越高,群体遗传一致性越低,其遗传多样性越丰富(谭杰等,2007)。本研究发现,半滑舌鲷真、伪雄鱼同母系的半同胞家系群体间的遗传多样性参数相近,而不同母系的群体间的遗传多样性参数略有差异。4 个半同胞家系群体的平均期望杂合度

表 5 4 个半滑舌鲷家系群体两两之间 22 个微卫星位点的遗传分化指数(F_{st})
Tab.5 Pair-wise comparison of the genetic differentiation index (F_{st}) of 22 microsatellite loci between four family populations of *C. semilaevis*

| 微卫星位点 Microsatellite loci | 遗传分化指数 F_{st} | | | | | |
|------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 108 and 109 | 113 and 114 | 108 and 113 | 108 and 114 | 109 and 113 | 109 and 114 |
| scaffold2104_64144 | 0.1429 | 0.0495 | 0.1346 | 0.0311 | 0.1918 | 0.0835 |
| scaffold365_18009 | 0.0436 | 0.2258 | 0.5221 | 0.1544 | 0.5244 | 0.1993 |
| scaffold170_8353 | 0.1733 | 0.0490 | 0.1629 | 0.0574 | 0.4022 | 0.2240 |
| scaffold3321_70434 | 0.3333 | 0.0410 | 0.0723 | 0.1429 | 0.2339 | 0.2308 |
| scaffold767_34395 | 0.0565 | 0.1447 | 0.1349 | 0.1686 | 0.0217 | 0.0979 |
| scaffold2585_68067 | 0.1131 | 0.0969 | 0.0568 | 0.2284 | 0.0897 | 0.3373 |
| scaffold1143_45424 | 0.0095 | 0.0670 | 0.0847 | 0.0185 | 0.0408 | 0.0128 |
| scaffold3931_70955 | 0.0012 | 0.0252 | 0.0324 | 0.0625 | 0.0395 | 0.0670 |
| scaffold224_10839 | 0.0526 | 0.1447 | 0.1722 | 0.1447 | 0.1020 | 0.0629 |
| scaffold709_32811 | 0.1201 | 0.0601 | 0.1770 | 0.1314 | 0.0507 | 0.0336 |
| scaffold414_19940 | 0.0084 | 0.0486 | 0.1380 | 0.1098 | 0.2070 | 0.1579 |
| scaffold079499 | 0.0112 | 0.0410 | 0.0013 | 0.0506 | 0.0124 | 0.0285 |
| scaffold1054_43419 | 0.0169 | 0.0379 | 0.1740 | 0.0682 | 0.0877 | 0.0194 |
| scaffold1785_59319 | 0.1289 | 0.0667 | 0.0930 | 0.1597 | 0.3809 | 0.4432 |
| scaffold426_14789 | 0.0518 | 0.2571 | 0.4667 | 0.0518 | 0.2571 | 0.0000 |
| scaffold363_12291 | 0.2250 | 0.1076 | 0.0691 | 0.0953 | 0.1737 | 0.3581 |
| scaffold4451_1100 | 0.0038 | 0.0429 | 0.0388 | 0.0953 | 0.0194 | 0.0778 |
| scaffold1170_46055 | 0.2077 | 0.0264 | 0.2163 | 0.1015 | 0.0004 | 0.0225 |
| scaffold2495_67575 | 0.1241 | 0.0028 | 0.0007 | 0.0007 | 0.1325 | 0.1167 |
| scaffold2841_69827 | 0.2491 | 0.0864 | 0.5509 | 0.8182 | 0.0875 | 0.2727 |
| scaffold1797_59428 | 0.1554 | 0.1511 | 0.0632 | 0.2827 | 0.1108 | 0.3511 |
| scaffold954_39899 | 0.7021 | 0.0924 | 0.7959 | 0.6610 | 0.0076 | 0.0820 |
| 平均值 Mean | 0.1211 | 0.0782 | 0.1737 | 0.1599 | 0.1448 | 0.1482 |

表 6 4 个家系群体间的 Nei's 遗传距离(对角线下)和遗传相似性系数(对角线上)

Tab.6 Nei's genetic distances (below diagonal) and genetic identities (above diagonal) among four family populations of *C. semilaevis*

| 家系群体 Family populations | 108 | 109 | 113 | 114 |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 108 | — | 0.7250 | 0.5577 | 0.5872 |
| 109 | 0.3215 | — | 0.6530 | 0.6339 |
| 113 | 0.5840 | 0.4261 | — | 0.8105 |
| 114 | 0.5323 | 0.4559 | 0.2101 | — |

低于徐营等(2011)报道的半滑舌鲷养殖群体和减数分裂雌核发育群体的平均期望杂合度 0.7303 和 0.5608, 表明人工选育的半滑舌鲷半同胞家系群体的遗传多样性下降。多态信息含量(PIC)是指一个后代所获得的某个等位基因标记来自它亲代的同一个等位标记的可能性大小, 平均多态信息含量是衡量等位基因片段多态性的理想指标。Botstein 等(1980)提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标, $PIC < 0.25$

为低度多态, $0.25 < PIC < 0.50$ 为中度多态, $PIC > 0.5$ 为高度多态。本研究中 4 个半同胞家系群体的平均多态信息含量分别为 0.4566、0.4254、0.5069、0.4795, 表明 4 个群体的遗传多样性处于中等水平。但与已报道的半滑舌鲷养殖群体的遗传多样性相比(徐营等, 2011), 半滑舌鲷真、伪雄鱼母系半同胞家系群体的遗传多样性明显下降。依据 Allendorf (1986)的研究, 群体遗传多样性每丧失 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。

遗传距离是衡量群体间遗传变异程度的重要参数。群体间亲缘关系越近, 则遗传变异性越低, 相似系数值越大, 遗传距离越小(邵长伟等, 2009)。本研究中的半滑舌鲷真、伪雄鱼同母系的 2 组半同胞家系群体间的遗传距离为 0.2101–0.3215, 小于不同母系的 家系群体间遗传距离 0.4261–0.5840, 这一点与人工养殖选育密切相关, 随着遗传多样性的减少, 群体间的遗传距离逐渐变小。

Wright (1951)对遗传分化系数(F_{st})大小与分化程

度的关系进行了界定：分化系数在 0–0.05 之间表示群体间分化很弱，0.05–0.15 之间表示分化中等，0.15–0.25 之间表示分化较大，大于 0.25 表示分化极大。本研究中的 4 个半滑舌鳎真、伪雄鱼母系半同胞家系群体间存在中等以上的遗传分化，这与半滑舌鳎群体中真、伪雄鱼个体生长性状存在较大的差异有密切关系。

本研究表明，半滑舌鳎真、伪雄鱼在生长性状上具有显著差异，同母本的真、伪雄鱼半同胞家系之间的遗传距离与遗传分化指数也显示真、伪雄鱼群体之间产生了一定程度的遗传分化。但其有效等位基因数、杂合度、多态信息含量、Shannon's 信息指数等遗传指标未出现显著性差异，表明半滑舌鳎真、伪雄鱼群体在遗传上存在一定的遗传分化，但其基本的遗传特征是稳定的。这也从另一个侧面说明了半滑舌鳎群体中同时存在真、伪雄鱼，而且能够稳定遗传的原因。关于这一奇特的遗传现象是遗传因素还是环境因素引起的，还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- Allendorf FW. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology*, 1986, 5(2): 181–190
- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man-using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA silver staining. *Biotechnology Advances*, 1997, 15(1): 175
- Chang JB, Lei GG, Li ZB, *et al.* The genetic structures of wild and cultivated populations of *Cynoglossus semilaevis*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 114–118 [常建波, 雷光高, 黎中宝, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 群体遗传结构的研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 114–118]
- Chen SL, Deng SP, Ma HY, *et al.* Molecular marker-assisted sex control in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture*, 2008, 283(1–4): 7–12
- Chen SL, Li J, Deng SP, *et al.* Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2007, 9(2): 273–280
- Chen SL, Li YZ, Zhang J, *et al.* Selection of the families with high growth rate and high female proportion in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 481–488 [陈松林, 李仰真, 张静, 等. 半滑舌鳎快速生长及高雌性家系的筛选. *水产学报*, 2013, 37(4): 481–488]
- Chen SL, Tian YS, Yang JF, *et al.* Artificial gynogenesis and sex determination in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(2): 243–251
- Daemen E, Cross T, Ollevier F, *et al.* Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Marine Biology*, 2001, 139(4): 755–764
- Deng SP, Chen SL, Tian YS, *et al.* Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 714–719 [邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎的性腺分化和温度对性别决定的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 714–719]
- Ferguson A. Molecular genetics in fisheries: Current and future perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1994, 4(3): 379–383
- Ji XS, Chen SL, Ma HY, *et al.* Natural sex reversal of female *Cynoglossus semilaevis* in rearing populations. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(2): 322–327 [季相山, 陈松林, 马洪雨, 等. 半滑舌鳎养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现. *水产学报*, 2010, 34(2): 322–327]
- Kocher TD, Lee WJ, Sobolewski AH, *et al.* A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 1998, 148(3): 1225–1232
- Liao XL, Ma HY, Xu GB, *et al.* Construction of a genetic linkage map and mapping of a female specific DNA marker in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(6): 699–709
- Lin NF, Su YQ, Ding SX, *et al.* Cross-species amplification of microsatellite markers from *Pseudosciaena crocea* in Sciaenidae. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 237–243 [林能峰, 苏永全, 丁少雄, 等. 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 237–243]
- Ma HY, Chen SL, Li J, *et al.* Development of female-specific AFLP marker CseF783 and its application in genetic sex identification in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Hereditas*, 2009, 31(1): 88–94 [马洪雨, 陈松林, 李静, 等. 半滑舌鳎雌性特异 AFLP 标记 CseF783 的克隆及其在遗传性别鉴定中的应用. *遗传*, 2009, 31(1): 88–94]
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590
- Rice WR. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, 1989, 43(1): 223–225
- Sambrook J, Maniatis TE, Fritsch EF. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 468–470
- Sha ZX, Luo XH, Liao XL, *et al.* Development and characterization of 60 novel EST-SSR markers in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(1): 322–331
- Shao CW, Liao XL, Tian YS, *et al.* Microsatellite marker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(1): 41–46 [邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2009, 30(1): 41–46]
- Tan J, Sun HL, Liu P, *et al.* Microsatellites analysis of genetic variation between natural and culture populations of *Apostichopus japonicus*. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(3): 38–43 [谭杰, 孙慧玲, 刘萍, 等. 仿刺参自然群体和养殖群体间遗传变异的微卫星标记研究. *海洋水产研*

- 究, 2007, 28(3): 38–43]
- Valizadeh M, Kang K, Kanno A, *et al.* Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphisms. *Breeding Science*, 1996, 46(1): 7–10
- Wang MY, Liu HJ. Correlation analysis between growth-related traits and microsatellite markers in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 121–129 [王美玉, 刘海金. 半滑舌鲷生长性状的微卫星标记筛选. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 121–129]
- Wright S. Genetical structure of populations. *Annals Eugenics*, 1951, 15(4): 323–354
- Wu XD, Lian ZQ, Hou YX, *et al.* Application analysis of microsatellite markers from *Silurus meriaionalis* on three species of Siluriformes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4): 638–645 [吴旭东, 连总强, 侯玉霞, 等. 大口鲮微卫星标记在三个鲮形目鱼类种群间适用性研究. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 638–645]
- Xu Y, Shao CW, Deng H, *et al.* Genetic analysis of cultured and gynogenetic stocks of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* by using SSR markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 14–19 [徐莹, 邵长伟, 邓寒, 等. 半滑舌鲷养殖群体和减数分裂雌核发育群体的微卫星标记遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 14–19]
- Zhang T, Lu HZ, Li XS. Genetic polymorphisms of 4 microsatellite loci in Guizhou Horse. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2009, 30(6): 19–21 [张涛, 路宏朝, 李新生. 贵州马4个微卫星位点遗传多态性研究. *家畜生态学学报*, 2009, 30(6): 19–21]
- Zhou LQ, Yang AG, Liu XZ, *et al.* The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 417–419 [周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鲷染色体核型分析. *水产学报*, 2005, 29(3): 417–419]

(编辑 马瑾艳)

The Phenotypic and Genetic Traits Analysis of ZZ Males and ZW Males (Sex-Inverted Males) of *Cynoglossus semilaevis*

LI Hong^{1,2}, TIAN Yongsheng^{1,4}①, LI Xiangkong^{1,3}, CHEN Zhangfan¹,
SONG Lini^{1,2}, DUAN Huimin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, 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. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract There are two kinds of male in the breeding populations of the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*, namely natural males (ZZ) and neomales (ZW). It is of great importance to study their phenotypic and genetic characteristics since the knowledge can improve its breeding techniques and seed cultivation. In this study, 15 phenotypic traits were measured between mature ZZ males and ZW males (sex-inverted males) of *C. semilaevis*. Analysis showed that highly significant differences between ZZ males and ZW males existed in seven traits, including body weight, full length, body length, body width, head length, eye spacing and eye diameter, with the growth rate of ZW males being higher than that of ZZ males. Furthermore, comparative analysis of the population genetic structures was processed among maternal half-sib families between ZZ and ZW males by using 50 pairs of specific microsatellite markers. Results showed that 22 out of 50 pairs of PCR amplified markers were polymorphic. Among four half-sib families, 232 alleles were identified with relatively higher mean allelic number (N_a) and mean expected heterozygosity (H_e) compared to mean effective allelic number (N_e) and observed heterozygosity (H_o) respectively. In addition, the average polymorphism information content (PIC) was 0.4566, 0.4254, 0.5069, 0.4795 among four half-sib families and there were 3, 3, 4 and 5 loci significantly deviated from Hardy-Weinberg expected genotypic frequencies. The Nei's genetic distance among the four families was 0.2101–0.5840, and the genetic similarity was 0.5577–0.8105. The current study indicated that there were significant differences among growth traits between ZZ and ZW males of *C. semilaevis*. Between the maternal half-sib families, there was relatively high genetic similarity, low genetic distance and similar genetic diversity index.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; ZZ male; ZW male; Phenotypic traits; Microsatellite marker; Genetic diversity

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn