

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2014.02.010

卵形鲳鲹育种群体遗传多样性分析

孙立元^{1,2}, 郭华阳¹, 朱彩艳¹, 马振华¹, 江世贵¹, 张殿昌¹,

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用 11 个微卫星位点, 对海南三亚和广东大亚湾 2 个卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 育种群体进行了遗传多样性评价和聚类分析。结果显示, 海南三亚和广东大亚湾 2 个卵形鲳鲹育种群体的平均等位基因 (N_a) 分别为 5.0 和 3.6, 平均有效等位基因 (N_e) 为 2.965 和 2.244, 观测杂合度 (H_o) 分别为 0.292 ~ 0.814 和 0.207 ~ 0.840, 期望杂合度 (H_e) 分别为 0.307 ~ 0.813 和 0.189 ~ 0.761, 海南三亚群体中多态信息含量 (PIC) 为 0.014 ~ 0.719, 平均为 0.509, 而广东大亚湾群体的 PIC 为 0.168 ~ 0.711, 平均为 0.436。海南三亚群体有 5 个位点偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.05$), 广东大亚湾群体有 2 个位点偏离哈迪-温伯格平衡; 2 个群体间的遗传相似系数为 0.561, 遗传距离为 0.578, 遗传分化指数 (F_{st}) 为 0.152。Structure 软件分析显示海南三亚和广东大亚湾 2 个卵形鲳鲹群体各为一支, 2 个群体间具有较大的遗传分化, 可作为 2 个育种群体管理, 2 个群体间进行杂交选育预期可获得较好的遗传进展。

关键词: 卵形鲳鲹; 遗传多样性; 微卫星; 群体; 遗传选育

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)02-0067-05

Genetic polymorphism of breeding populations of golden pompano (*Trachinotus ovatus*)

SUN Liyuan^{1,2}, GUO Huayang¹, ZHU Caiyan¹, MA Zhenhua¹, JIANG Shigui¹, ZHANG Dianchang¹

(1. Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: We used 11 pairs of microsatellite loci to investigate the genetic polymorphism of two breeding populations of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Sanya, Hainan and Daya Bay, Guangdong. The average numbers of alleles (N_a) at each microsatellite locus of the populations were 5.0 and 3.6, respectively; the average numbers of valid alleles (N_e) were 2.965 and 2.244, respectively. The observed heterozygosities (H_o) were 0.292 ~ 0.814 and 0.207 ~ 0.840, respectively; the expected heterozygosities (H_e) were 0.307 ~ 0.813 and 0.189 ~ 0.761, respectively. The PIC value ranged from 0.014 to 0.719 in Sanya population with an average of 0.509, while that of the Daya Bay population ranged from 0.168 to 0.711 with an average of 0.436. In Sanya population, five loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$), while only two loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium in Daya Bay population. The Nei's genetic similarity coefficient of the two populations was 0.561 and their genetic distance was 0.578. The genetic differentiation index of the two breeding populations (F_{st}) was 0.152. Structure analysis indicates that the two *T. ovatus* populations,

收稿日期: 2013-10-28; 修回日期: 2013-11-13

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A0401, 2013A0501); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2012TS05); 三亚市农业科技创新项目(2012NK23); 国家科技基础条件平台建设项目(2013DKA-007)

作者简介: 孙立元(1986-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类种质资源与遗传育种研究。E-mail: sunliyuan198691@163.com

通信作者: 张殿昌(1977-), 男, 博士, 副研究员, 从事水产种质资源与遗传育种研究。E-mail: zhangdch@scsfri.ac.cn

which had higher genetic differentiation, were divided into two groups and could be managed as two breeding populations. Good genetic progress could be achieved by hybridization between the two breeding populations.

Key words: *Trachinotus ovatus*; genetic diversity; microsatellite DNA; population; genetic breeding

卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 隶属于鲈形目, 鲳科, 鲳属, 俗称为金鲳、黄腊鲳^[1], 是一种中上层暖水性的广盐性鱼类, 广泛分布于东南亚和地中海地区的热带和亚热带海域, 在中国主要分布于广东、广西、海南、福建沿海。由于卵形鲳鲹肉味鲜美, 生长速度快, 目前已成为中国华南沿海最重要的海水养殖对象之一^[2-3]。卵形鲳鲹的池塘养殖始于2004年^[4], 此后国内外也陆续开展了卵形鲳鲹人工繁殖技术的研究^[5]。近年来对卵形鲳鲹的研究主要集中在同工酶、胚胎发育、投饵以及盐度对胚胎发育的影响等方面^[6-9]。在卵形鲳鲹种质遗传结构方面, 彭敏和陈晓汉^[10]利用 AFLP 技术分析了卵形鲳鲹北部湾野生群体和养殖群体的遗传多样性, 结果表明养殖群体在封闭的繁殖环境下低频基因丢失, 因此, 在卵形鲳鲹遗传选育过程中应保持一定大小的育种群体, 防止近交衰退; 吉磊等^[11]利用布氏鲳鲹 (*T. blochii*) 微卫星标记分析3个卵形鲳鲹养殖群体的遗传多样性, 结果表明微卫星引物在种间具有通用性, 且3个群体作为育种对象具有较高的选择潜力。近年来, 为了选育具有优良性状的卵形鲳鲹新品种, 笔者实验室收集保存了2个群体作为育种亲本, 但是目前这2个育种群体的遗传结构还不清楚。因此, 评价这2个育种群体的遗传多样性水平可为遗传选育过程中亲本选择提供参考依据。

微卫星 DNA (microsatellites DNA), 又称简单重复序列, 是一种广泛分布于真核生物基因组中的一种简单重复 DNA 片段。与其他的分子标记相比较, 微卫星 DNA 标记具有含量丰富, 分布广且均匀, 多态信息含量高, 为共显性遗传, 遵守孟德尔遗传定律, 保守型高、通用性良好、技术难度低以及进化所受选择压力小等优点, 在动植物群体遗传多样性评价、谱系分析等方面^[12]显示出巨大的优势。笔者研究利用11个微卫星位点, 对2个卵形鲳鲹育种群体进行了遗传多样性评价, 以期为卵形鲳鲹遗传选育过程中的亲本配对策略提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品为采集于广东大亚湾和海南三亚海域的2

个卵形鲳鲹养殖育种群体, 从2个群体随机抽取的32尾和48尾个体上, 分别剪取少量背部鳍条, 用无水乙醇固定, 运回实验室备用。

1.2 DNA 的提取、检测

分别取卵形鲳鲹背部鳍条组织约0.1 g, 利用“酚-氯仿”法提取 DNA^[13], 应用 Thermo NanoDrop 2000 (Eql-Thermo SCIENTIFIC, 美国产) 检测 DNA 的质量浓度与纯度, 用1.5%的琼脂糖胶评估 DNA 的完整性, 调整 DNA 质量浓度至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 储存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 中备用。

1.3 微卫星位点和 PCR 扩增

参照 SUN 等^[14]的研究, 选取 TO12、TO24、TO28-2、TO33、TO41、TO67、TO80、TO87、TO127-1、TO129 和 TO132-2 共11个微卫星位点, 合成引物。15 μL 的反应体系包含 1.5 μL 的 $10 \times$ PCR 缓冲液, 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTPs, 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的正反向引物, 1.0 U 的 *Taq* 聚合酶 (Takara) 以及 50 ng 的 DNA 模板。PCR 的反应程序为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s, 退火 45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 循环 35 次; 反应结束后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。所有的 PCR 反应均在 Eppendorf PCR 仪上完成。

1.4 PCR 扩增产物的电泳分析

PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 然后 1 μL 的 PCR 产物加到 9 μL 含有荧光染料的去离子甲酰胺 HiDi (其中 1 mL HiDi 中含有 10 μL 荧光染料) 中, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 下变性 5 min, 然后立即置于冰上, 最后将样品在毛细管 DNA 测序仪 3130 xl (Applied Biosystems Inc, ABI 公司出品) 上进行基因分型。

1.5 数据统计

利用 GeneMapper V4.0 (Applied Biosystems) 统计微卫星 DNA 等位基因的大小; 利用 POPGENE 32^[15] 计算等位基因数 (N_e)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数 (d) 以及遗传距离和遗传相似系数, 利用 Software Cervus 3.0^[16] 评估群体的多态性信息含量 (PIC), 利用 Structure 软件进行聚类分析, 利用 MEGA 5.1 软件构建 2 个群体共

80 个个体的 UPGMA 系统树。

2 结果与讨论

2.1 遗传多样性分析

2 个卵形鲳鲹群体的相关遗传参数列于表 1。 N_a 和 N_e 都反映了群体遗传变异差异的大小, 等位基因在群体中分布的越均匀, N_e 就越接近 N_a 。海南三亚群体的 N_a 为 2~10, 平均为 5, 平均 N_e 为 2.965; 而广东大亚湾海域群体的 N_a 为 2~7, 平均为 3.6, 平均 N_e 为 2.244, 与吉磊等^[11]的研究结果基本相似, 但高于彭敏和陈晓汉^[10]的研究结果。2 个群体的平均 N_e 均小于 N_a , 主要是等位基因在群体中的分布不均匀, 使某些等位基因的频率相对较高、有些相对较低引起的, 并且海南三亚群体的基因分布更不均匀。等位基因的结构对群体的平均杂合度有一定的影响, 群体内的平均遗传杂合度表示被检测位点在群体中杂合子的频率, 实际上是群体杂合度的一个度量单位, 它反映了群体一致性的高低。群体平均基因杂合度越低, 反映该群体的遗传一致性越高, 即群体的遗传变异越少, 群体的遗传多样性越差。该研究中 2 个群体的基因杂合度为 0.207~0.840, 其中海南三亚群体的平均观测杂合度为 0.598, 广东大亚湾群体的平均观测杂合度为 0.573, 均高于吉磊等^[11]的试验结果, 2 个

群体的遗传多样性基本相似, 处于中等分化水平。

微卫星位点的多态性主要表现在微卫星核心序列的顺序和重复数目的不同。一般 $PIC > 0.5$ 本群体该位点表现为高度多态性, $0.25 < PIC < 0.5$ 该位点表现为中度多态性, $PIC < 0.25$ 该位点表现为低度多态性^[17]。海南三亚群体中有 6 个高度多态性微卫星位点 (TO41、TO67、TO87、TO127-1、TO129、TO132-2), 位点 TO24 为低度多态性, 其余均为中度多态性, 平均 PIC 为 0.509; 广东大亚湾群体中有 4 个高度多态性位点 (TO33、TO41、TO67 和 TO132-2), TO28-2 和 TO80 这 2 个位点为低度多态性位点, 其他为中度多态性位点, 平均 PIC 为 0.436, 2 个群体高度多态性位点所占总位点的比例为 45.50% (表 1)。而彭敏和陈晓汉^[10]的研究显示养殖群体和野生群体的平均多态位点都比较低, 野生群体平均多态性位点比例仅为 23.60%, 说明广东大亚湾和海南三亚 2 个育种群体具有较丰富的遗传变异。

HEW 偏离指数 d 反映了 H_o 和 H_e 之间的平衡关系。 d 越接近 0, 说明基因型的分布越接近于平衡状态; $d > 0$ 说明该群体的杂合子过剩; $d < 0$ 说明该群体处于杂合子缺失状态^[18]。该研究中海南三亚海群体的遗传偏离指数平均为 -0.09, 广东大亚湾群体的平均偏离指数为 0.138, 说明 2 个群体

表 1 11 个微卫星位点在 2 个卵形鲳鲹群体中的遗传多样性分析

Tab. 1 Genetic diversity of 11 microsatellite loci in two breeding populations of *T. ovatus*

编号 No.	海南三亚育种群体 breeding population of Sanya						广东大亚湾育种群体 breeding population of Daya Bay					
	N_a	N_e	H_o	H_e	d	PIC	N_a	N_e	H_o	H_e	d	PIC
TO12	3	2.290	0.511	0.569	-0.102	0.468	3	1.834	0.469	0.408	0.015	0.386
TO24	4	2.520	0.787	0.611	0.288	0.014	2	1.557	0.467	0.364	0.103	0.294
TO28	2	1.492	0.333	0.333	0.000	0.275	2	1.228	0.207	0.189	0.096	0.168
TO33	4	2.378	0.417	0.524	-0.204	0.422	3	2.590	0.774	0.624	0.240	0.536
TO41	6	3.192	0.617	0.694	-0.111	0.652	5	3.631	0.750	0.736	0.019	0.676
TO67	10	3.904	0.609	0.752	-0.190	0.719	7	3.777	0.778	0.761	0.022	0.711
TO80	5	1.436	0.292	0.307	-0.708	0.278	2	1.547	0.344	0.289	0.187	0.244
TO87	6	3.486	0.609	0.721	-0.155	0.663	3	2.119	0.623	0.538	0.196	0.421
TO127	6	5.101	0.814	0.813	0.001	0.777	5	1.975	0.613	0.502	0.221	0.433
TO129	4	3.320	0.792	0.706	0.122	0.641	5	1.608	0.438	0.384	0.140	0.356
TO132	5	3.796	0.792	0.744	0.065	0.693	3	2.822	0.840	0.659	0.275	0.570
平均 average	5	2.965	0.598	0.616	-0.090	0.509	3.6	2.244	0.573	0.496	0.138	0.436

基因型分布基本处于平衡状态,两者没有明显的差异,海南三亚群体基因型更趋于平衡。

2.2 遗传距离与遗传分化指数

群体间的遗传关系是利用等位基因频率计算2个群体间的遗传距离与遗传相似系数。该研究中2个群体间的遗传距离为0.578,2个群体间的遗传相似系数为0.561,遗传距离远远大于吉磊等^[11]的研究结果。遗传分化指数(F_{st})是衡量群体间遗传分化的一个重要指标。 $0 < F_{st} < 0.05$ 表明群体的分化较弱; $0.05 < F_{st} < 0.15$ 表明群体为中度分化; $0.15 < F_{st} < 0.25$ 表明群体间的分化较大; $F_{st} > 0.25$ 表明群体间的分化很大^[17]。该研究 AMOVA 分析结果表明,2个群体的 F_{st} 为 0.021 ~ 0.482, 平均为 0.152, 说明2个群体间具有较大的遗传分化。

对2个群体的80个个体进行UPGMA聚类分析,除H20和H45 2个海南三亚群体的个体外,2个群体分别单独聚为一支,说明2个群体的分化比较明显,但存在一定的基因交流(图1)。个体间的遗传距离越远,其后代表现杂种优势越明显,聚类分析结果可为遗传育种中亲本的选配提供理论依据。

对种群结构的了解可以有助于估算有效群体大小,并且制定科学的管理和保护策略^[19]。笔者利用 Structure 2.3 软件,根据 PRITCHARD 等^[20]的方法检测2个群体的遗传分化,图2合理的群体数目 K 为 2, 聚类结果见图3,即2个群体可以清楚地聚为2支,其种群划分与地理划分结果一致。笔者研究结果显示了2个群体间较少的基因流,这充分说明了2个群体间具有较大的遗传分化。

3 小结

笔者研究评价了2个卵形鲳鲹群体的遗传多样性,2个群体的平均 PIC 为 0.436 ~ 0.509, 说明了2个群体的遗传多样性较高; HEW 偏离指数 d 表明2个群体的基因型分布基本处于平衡状态; 经遗传距离、遗传分化指数、亲本间的遗传距离分析可知,2个群体表现出较高的遗传分化。根据现代遗传学理论可知,亲本的遗传距离越远,杂种优势越明显。笔者研究结果表明,2个育种群体之间杂交,可能会出现比较优良的杂种优势,并且个体间的聚类分析可为卵形鲳鲹遗传选育过程中的亲本配对策略提供理论支持。

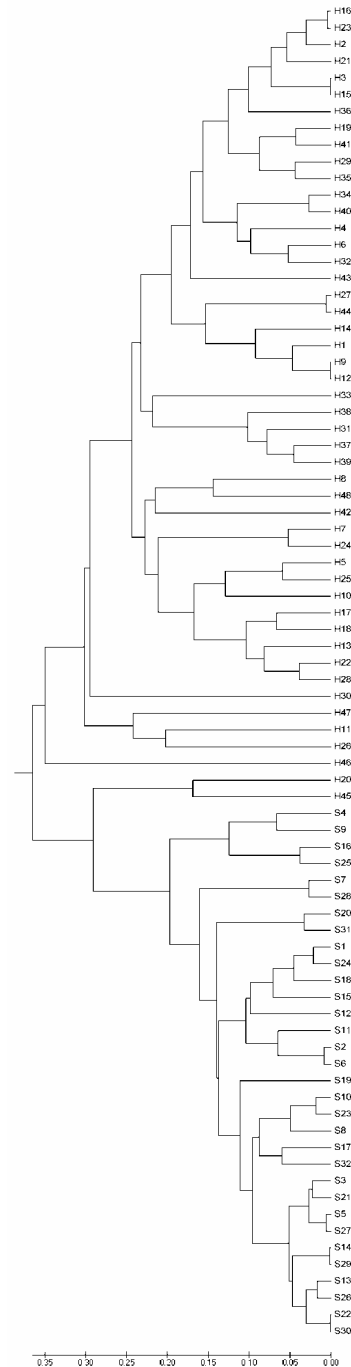


图1 卵形鲳鲹80个个体的UPGMA系统进化树
H. 海南三亚海群体; S. 广东大亚湾群体

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 80 individuals of *T. ovatus*
H. population in Sanya, Hainan; S. population
in Daya Bay, Guangdong

参考文献:

- [1] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 341-342.
- [2] TUTMAN P, GLAVIC N, KOZUL V, et al. Preliminary informa-

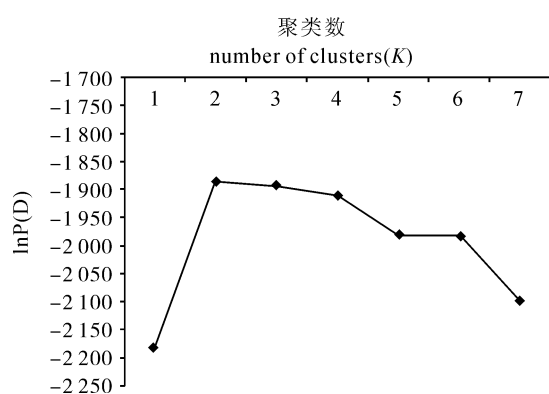


图2 Structure 分析中 lnP(D) 与 K 的关系图

Fig. 2 Relationship between lnP(D) and K value by Structure analysis



图3 卵形鲳鲹 2 个群体 Structure 聚类图

Fig. 3 Structure bar plot of membership for two *T. ovatus* populations

tion on feeding and growth of pompano, *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) (Pisces; Carangidae) in captivity[J]. *Aquac Int*, 2004, 4/5(12): 387-393.

- [3] 刘兴旺, 王华朗, 张海涛, 等. 卵形鲳鲹幼鱼饲料中适宜蛋白能量比的研究[J]. *水产科学*, 2011, 30(3): 136-139.
- [4] 刘贤敏, 刘晋, 刘康, 等. 2010 年华南地区金鲳鱼养殖报告[J]. *当代水产*, 2011, 33(2): 27-28.
- [5] 陈伟洲, 许鼎盛, 王德强, 等. 卵形鲳鲹人工繁殖及育苗技术研究[J]. *台湾海峡*, 2007, 26(3): 435-442.
- [6] 许晓娟, 李加儿, 区又君. 盐度对卵形鲳鲹胚胎发育和早期仔鱼的影响[J]. *南方水产*, 2009, 5(6): 31-35.
- [7] 区又君, 李加儿. 卵形鲳鲹的早期胚胎发育[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 786-789.

- [8] 齐旭东, 区又君. 卵形鲳鲹不同组织同工酶表达的差异[J]. *南方水产*, 2008, 4(3): 38-42.
- [9] 许晓娟, 区又君, 李加儿. 延迟投饵对卵形鲳鲹早期仔鱼阶段摄食、成活及生长的影响[J]. *南方水产*, 2010, 6(1): 37-41.
- [10] 彭敏, 陈晓汉. 卵形鲳鲹养殖群体和野生群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *西南农业学报*, 2011, 5(24): 1987-1991.
- [11] 吉磊, 区又君, 李加儿. 卵形鲳鲹 3 个养殖群体的微卫星多态性分析[J]. *热带海洋学报*, 2011, 30(3): 62-68.
- [12] 宋国华, 刘田福. 微卫星标记及其在实验动物中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(4): 244-248.
- [13] MA H Y, CHEN S L. Isolation and characterization of 31 polymorphic microsatellite markers in barfin flounder (*Verasper moseri*) and the cross-species amplification in spotted halibut (*Verasper variegatus*) [J]. *Conserv Genet*, 2009, 5(10): 1591-1595.
- [14] SUN L Y, ZHANG D C, JIANG S G, et al. Isolation and characterization of 21 polymorphic microsatellites in golden pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Conserv Genet Resour*, 2013, 5(4): 1107-1109.
- [15] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. *Belg J Bot*, 1997, 129(157): 1-25.
- [16] KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Mol Ecol*, 2007, 5(16): 1099-1106.
- [17] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331.
- [18] 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[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(1): 13-19.
- [19] NUNNEY L. The limits to knowledge in conservation genetics[J]. *Evol Biol*, 2000, 32(9): 179-194.
- [20] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.