

# 大菱鲆 4 个引进地理群体遗传多样性的微卫星分析

侯仕营<sup>1,2</sup> 马爱军<sup>1\*</sup> 王新安<sup>1</sup> 黄智慧<sup>1</sup> 薛宝贵<sup>1,2</sup> 杨志<sup>3</sup> 曲江波<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>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, 266071)

(<sup>2</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(<sup>3</sup>烟台开发区天源水产有限公司, 264003)

**摘 要** 利用 12 对微卫星分子标记对大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 4 个引进地理群体进行遗传多样性分析。结果表明,等位基因数( $A$ )为 2~10 个,平均等位基因数为 4.3,有效等位基因数( $N_e$ )为 1.6~6.1,平均有效等位基因数为 2.7,各位点的杂合度观测值( $H_o$ )为 0.000 0~0.562 5,杂合度期望值( $H_e$ )为 0.382 3~0.841 6。各群体之间无偏倚杂合度期望值由小到大依次为丹麦群体、英国群体、法国群体、挪威群体,运用 SPSS 软件对无偏倚杂合度期望值进行 Kruskal-Wallis 检验,其结果( $H=4.438, df=3, P=0.218$ )表明,4 个群体的遗传多样性差异不显著。群体间平均遗传分化指数( $F_s$ )为 0.111 7,各群体之间存在中度遗传分化。用 UPGMA 法进行聚类分析,4 个群体聚为两类,挪威群体和丹麦群体聚为一类,法国群体和英国群体聚为一类。结合 Hardy-Weinberg 平衡和遗传偏离指数( $d$ ),4 个群体都不同程度的偏离平衡。4 个群体具有一定的遗传分化、较好的遗传多样性,适合作为大规模家系选育的基础群体。

**关键词** 大菱鲆 地理群体 微卫星 遗传多样性

**中图分类号** Q959.486; Q173 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0016-08

## Analysis of genetic structure among four different stocks of turbot *Scophthalmus maximus* using microsatellite technique

HOU Shi-ying<sup>1,2</sup> MA Ai-jun<sup>1\*</sup> WANG Xin-an<sup>1</sup> HUANG Zhi-hui<sup>1</sup>  
XUE Bao-gui<sup>1,2</sup> YANG Zhi<sup>1</sup> QU Jiang-bo<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

(<sup>2</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(<sup>3</sup>Yantai Tianyuan Aquatic Limited Corporation, 264003)

**ABSTRACT** Genetic diversities within and between four geographical stocks of turbot *Scophthalmus maximus* (imported from Norway, Denmark, France, and UK) were assessed through 12 microsatellite loci. The results showed that the number of alleles ( $A$ ) and effective alleles ( $N_e$ ) were in the range of 2~10 and 1.6~6.1, with an average of 4.3 and 2.7, respec-

现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-50)、国家支撑计划专题(2006BAD01A12012)、农业公益性行业科研专项经费(nyhyzx07-046)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(2009-ts-11)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: maaj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85835103

收稿日期:2010-02-02;接受日期:2010-03-09

作者简介:侯仕营(1982-),男,硕士研究生,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: bihaiwh@yahoo.com.cn, Tel: 15953263049

tively. The observed heterozygosities ( $H_o$ ) and unbiased expected heterozygosities ( $H_e$ ) ranged in 0.000 0~0.562 5 and 0.382 3~0.841 6 respectively. The rank of the  $H_e$  values for the four stocks in an increasing order was: Denmark < UK < France < Norway. A comparison by Kruskal-Wallis test (SPSS software) ( $H=4.438, df=3, P=0.218$ ) revealed that there was no significant difference in genetic diversities of the four geographical stocks. Genetic diversity coefficient ( $F_s$ ) was 0.111 7, which indicated that there was moderate genetic differentiation among these four geographical stocks. The genetic distance of the four geographical stocks was calculated and the cluster analysis by UPGMA method was carried out. The stocks were pooled into two groups: one group of Norway and Denmark stocks, the other group of France and UK stocks. Hardy-Weinberg equilibrium and genetic deviation index ( $d$ ) showed a reasonable difference within each stock.

**KEY WORDS** Turbot *Scophthalmus maximus* L. Geographical stock  
Microsatellite DNA Polymorphic analysis

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* L. 是原产于欧洲的著名海水养殖品种。因其具有生长迅速、肉味鲜美、耐低氧、食物转化率高等优点深受人们的喜爱(雷霖霖 1983, 2000)。中国水产科学研究院黄海水产研究所于 1992 年“跨洋引种”将其引入我国, 1999 年突破了大规模育苗的关键技术。目前已成为我国特别是北方地区的主要养殖品种(雷霖霖 2001; 马爱军等 2000)。近年来, 由于盲目引进以及对引进品种的遗传背景不清楚等原因, 导致孵化率和成活率降低、生长速度减慢、抗逆性变差、白化严重等系列种质退化现象不断发生(雷霖霖等 2005; 申雪艳等 2004)。因此, 对大菱鲆进行遗传改良已成为一项非常紧迫的任务。而要进行遗传改良, 首先要选择大量的基础群体, 并对这些基础群体的遗传背景进行深入研究。

微卫星标记技术已广泛的应用于水产动物的种群鉴定、选择育种(朱 滨等 1999), 是一种较为理想的标记方法。目前, 有关利用微卫星标记对大菱鲆进行遗传背景分析的报道, 普遍存在着利用微卫星位点数量较少的问题(申雪艳等 2004; Bouza *et al.* 2002; Coughlan *et al.* 1998; Nielsen *et al.* 2004; Florin *et al.* 2007), 直接影响到标记的准确性和精确性。因此, 利用大量微卫星标记对大菱鲆进行相关分析, 以期精确地评估不同群体的遗传背景, 构建大规模家系选育所需的基础群体已成为当务之急。

作者运用 12 对微卫星标记, 比较分析引进挪威、丹麦、法国和英国 4 个不同地理群体大菱鲆的遗传结构, 为进行大菱鲆的大规模家系选育提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集

实验所用大菱鲆样本为烟台天源水产有限公司提供, 其挪威群体为 2002 年 6 月 10 日从挪威引进的 5cm 苗种; 丹麦群体为 2003 年 4 月 4 日引进丹麦群体的 5cm 苗种; 法国群体为 2003 年 9 月 22 日从法国引进的 5cm 苗种; 英国群体为 2002 年 8 月 11 日从英国引进的约 5cm 苗种。每组样本数量 20 尾, 剪取尾鳍鳍条分装于液氮中, 到达实验室后置于  $-80^{\circ}\text{C}$  中保存。

### 1.2 总 DNA 的提取

参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁等 1992) 及 Aljanabi 等(1997)的方法提取大菱鲆样品的 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 GENEVIEW 染色鉴定。GENEQUAN Tpro (Pharmacia Biotech Ltd) RNA/DNA 分析定量仪定量, 用超纯水稀释成  $50\text{ng}/\mu\text{l}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 PCR反应及电泳结果分析

本研究所利用的微卫星引物 Sma01、Sma02、Sma03、Sma06、Sma09、Sma10 以及 Sma12 来自 Chen 等(2007)。PCR 反应体系为 25 $\mu$ l, 包括 0.4 $\mu$ mol/L 引物, 0.2mmol/L dNTP, 1 $\times$  PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 1.5 或 2mmol/L(表 1), 0.75U Taq 酶, 100ng 模板 DNA。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 退火 50s(各引物的退火温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 50s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。微卫星引物 Sma-usc12、Sma-usc25、Sma-usc34、Sma-usc35 和 Sma-usc36 来自 Pardo 开发的大菱鲆微卫星引物(Pardo *et al.* 2006)。PCR 反应体系为 15 $\mu$ l, 包括 1 $\mu$ mol/L 引物(表 1), 0.1mmol/L dNTP, 1.5 $\times$  PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 1.5mmol/L, 0.5U Taq 酶, 30ng 模板 DNA。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 退火 50s(各引物的退火温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 50s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。各位点引物序列、退火温度及 GenBank 登录号见表 1。

表 1 引物序列及特异退火温度

Table 1 Sequence and specific annealing temperature of microsatellite primers

位点 Locus	引物序列 Primer sequence(5'-3')	复性温度( $^{\circ}$ C) Annealing temperature	MgCl <sub>2</sub> (mmol/L) MgCl <sub>2</sub>	GenBank 登录号 GenBank accession No.
Sma01	F: TGTTGCTTTGCTCCTTTTC	56	2.0	DQ659661
	R: TAGTGGAACGGCTCTAGGT			
Sma02	F: TGTCTCTCGTCAGTGGCAGT	56	2.0	DQ659648
	R: AAAGTGCAGCCTCCAAGATG			
Sma03	F: TGGACTGGTTTACTGCTGGA	56	1.5	DQ454081
	R: AGGGAACCGATCTGAGAACA			
Sma06	F: GACCCAACGAGCACTGTT	57	1.5	DQ454088
	R: GGGCCAACATCATTATGG			
Sma09	F: CGACCCGCCACTACAGGAT	57	1.5	DQ659638
	R: AGCGACAGCAACGCACCAAG			
Sma10	F: GGTGGCTGGGTAAATCTGTT	60	1.5	DQ659659
	R: CTTCCCTCCGTCTACGCTCC			
Sma12	F: CTGCAAGCCTTGATAACCACT	58	2.0	DQ659675
	R: TTCCGCTGCCTTTATGTGAG			
Sma-usc12	F: ATGCTGTCCCTTGATTTCAA	56	1.5	DQ470749
	R: CCATTATGCCTGTCTGTCCA			
Sma-usc25	F: AGCCCACTGCCATGAATAGA	56	1.5	DQ470762
	R: CACAGTTGAAGCACACAGCA			
Sma-usc34	F: ATGTGTAGAACCGCCTGCTG	55	1.5	DQ470771
	R: GAGGTTGTGGTCAAAGGCTAA			
Sma-usc35	F: ACAAATGGTCACTTACTGCATC	55	1.5	DQ470772
	R: GTCCACCACCACTTACACC			
Sma-usc36	F: CCCTTTCTCCATTCTCTCC	57	1.5	DQ470773
	R: CATCTCAACTGCGCTGAACT			

PCR 产物在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 硝酸银染色。待凝胶干燥后使用扫描仪记录电泳图谱, 根据每一个体产生的条带位置确定其基因型。用群体遗传学分析软件 Popgene 1.32 进行数据处理。

### 1.4 数据分析

通过计算每个位点的等位基因数( $A$ )、有效等位基因数( $N_e$ ) (Crow *et al.* 1965)、平均观察杂合度( $H_o$ )、平均无偏倚杂合度期望值( $H_e$ ), 同时计算了各群体在各个位点的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $d$ )、各群体间的遗传相似性系数( $I$ )和遗传距离( $D$ ) (Nei *et al.* 1975), 运用 F-检验(Wright 1978)和基于基因型的  $P$  值(Levene 1949)等, 进行遗传多样性分析。采取 UPGMA 方法对 4 个群体进行聚类。上述参数均由群体遗

传学分析软件 Popgene 1.32 分析得到。参照 Botstein 等(1980)的方法,计算了多态信息含量  $PIC$  (Polymorphism Information Content)。用 SPSS 13.0 软件对各群体各位点的杂合度期望值( $H_e$ )进行 Kruskal-Wallis 检验。

## 2 结果

### 2.1 遗传多样性

对 12 个多态性位点进行 PCR 扩增,共得到 52 个等位基因。图 1 所示为大菱鲆位点 Smac03 在法国群体和 Smac06 在英国群体的电泳图。

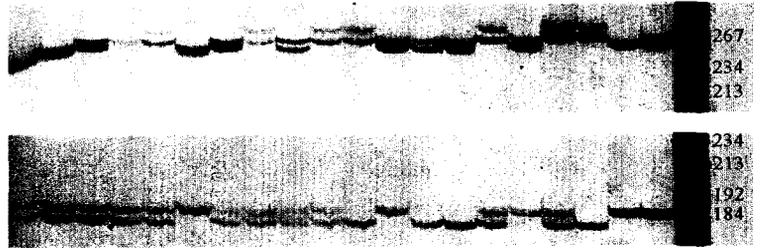


图 1 大菱鲆位点 Smac03 在法国群体和位点 Smac06 在英国群体的电泳  
Fig.1 Electrophoresis of microsatellite locus amplified by Smac03 in the France stock and by Smac06 in the UK stock of turbot *S. maximus*

应用 Popgene 1.32 群体遗传学分析软件对大菱鲆群体进行遗传多样性分析,反应各个座位在养殖群体遗传多样性的参数  $A$ 、 $N_e$ 、 $H_o$ 、 $H_e$ 、 $PIC$  列于表 2 中。在所检测的 12 个位点中,Smac01、

Smac02、Smac03、Smac06、Sma-usc34、Sma-usc35、Sma-usc36 呈中度多态性( $0.25 < PIC < 0.5$ ),其余位点均呈高度多态性( $PIC > 0.5$ )。12 个位点的等位基因数为 2~10 个,平均等位基因数为 4.3;有效等位基因数为 1.6~6.1,平均有效等位基因数为 2.7;各位点的杂合度观测值( $H_o$ )为 0.000 0~0.562 5,杂合度期望值( $H_e$ )为 0.382 3~0.841 6;平均多态信息含量( $PIC$ )为 0.334 8~0.815 7。

表 2 大菱鲆引进 4 个不同地理群体在各位点的等位基因数、有效等位基因数、杂合度观测值、杂合度期望值、多态信息含量

Table 2 Number of alleles ( $A$ ) and effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Polymorphism Information Content ( $PIC$ ) at the 12 microsatellite loci of the four geographical stocks of turbot *S. maximus*

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 $PIC$
Smac01	4	2.209 6	0.550 0	0.550 9	0.491 8
Smac02	3	1.770 9	0.000 0	0.438 1	0.393 6
Smac03	3	1.947 7	0.350 0	0.489 6	0.399 3
Smac06	2	1.995 0	0.250 0	0.501 9	0.374 4
Smac09	3	2.432 1	0.450 0	0.592 5	0.500 2
Smac10	3	2.579 1	0.437 5	0.616 1	0.530 1
Smac12	5	3.633 3	0.562 5	0.729 3	0.679 8
Sma-usc12	5	4.474 0	0.325 0	0.781 4	0.739 5
Sma-usc25	10	6.109 8	0.312 5	0.841 6	0.815 7
Sma-usc34	6	1.953 9	0.362 5	0.491 3	0.450 6
Sma-usc35	4	1.612 7	0.425 0	0.382 3	0.334 8
Sma-usc36	4	2.033 4	0.137 5	0.511 4	0.474 4
Mean	4.3	2.7	0.346 9	0.577 2	0.515 4

表 3 大菱鲆引进 4 个不同地理群体在 12 个微卫星座位的平均等位基因数、有效等位基因数、杂合度观测值、无偏杂合度期望值、多态信息含量

Table 3 Number of alleles ( $A$ ), effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Polymorphism Information Content ( $PIC$ ) in the four imported geographical stocks of turbot *S. maximus*

群体 Stock	平均等位基因数 $A$	有效等位基因数 $N_e$	杂合度观测值 $H_o$	无偏杂合度期望值 $H_e$	多态信息含量 $PIC$
挪威 Norway	3.416 7	2.389 2	0.329 2	0.565 8	0.487 3
丹麦 Denmark	2.416 7	1.907 7	0.287 5	0.412 0	0.340 8
法国 France	3.500 0	2.389 1	0.425 0	0.561 1	0.485 4
英国 UK	3.333 3	2.453 1	0.345 8	0.544 8	0.472 7

各群体中,丹麦群体的遗传多样性最低,挪威群体的最高(表3)。对4个群体的无偏倚杂合度期望值( $H_e$ )进行Kruskal-Wallis检验,结果( $H=4.438, df=3, P=0.218$ )说明,各群体的遗传多样性虽有差异,但并没有达到统计上的显著水平。

## 2.2 群体的遗传分化

4个群体间遗传分化指数( $F_{st}$ )和基因流( $N_m$ )见表4,各群体之间存在轻度遗传分化( $F_{st}<0.05$ )的位点有3个;有中度遗传分化( $0.05<F_{st}<0.15$ )的位点有6个;有较大遗传分化( $0.15<F_{st}<0.25$ )的位点有1个;有极大遗传分化( $F_{st}>0.25$ )的位点有两个。表明各群体间存在一定程度的遗传分化。各群体的平均遗传分化指数为0.1117,各群体之间存在中度遗传分化。由表5两两群体间的 $F_{st}$ 平均值可知,英国群体与法国群体间的遗传分化程度最低,法国群体与丹麦群体之间的分化程度最高,但总体上各群体间遗传分化程度较弱,说明遗传变异主要来自群体内个体之间。 $N_m$ 与 $F_{st}$ 是负相关的,因此基因流所反映的群体遗传分化与遗传分化指数是相似的。根据基因流的大小在群体间遗传分化较小( $N_m>4$ )的位点有Smac01、Smac06、Sma-usc34和Sma-usc35;在群体间存在较大分化( $N_m<1$ )的位点有Smac02和Smac10;其余6个位点在各群体之间存在一定程度的分化。

根据Nei(1978)的计算方法计算了各群体间的遗传相似性系数( $I$ )和遗传距离( $D$ )(表6)。英国和法国的遗传距离最近(0.0691),法国和挪威的遗传距离最远(0.2388)。

表4 大菱鲆引进4个不同地理群体各位点的遗传分化指数( $F_{st}$ )和基因流( $N_m$ )

Table 4 Genetic diversity coefficient( $F_{st}$ ) and gene flow( $N_m$ ) among the four imported geographical stocks of turbot *S. maximus*

位点 Locus	遗传分化指数 $F_{st}$	基因流 $N_m$	位点 Locus	遗传分化指数 $F_{st}$	基因流 $N_m$
Smac01	0.049 0	4.857 1	Sma-usc12	0.081 6	2.813 8
Smac02	0.259 2	0.714 7	Sma-usc25	0.165 2	1.262 9
Smac03	0.085 4	2.676 7	Sma-usc34	0.054 6	4.331 4
Smac06	0.025 1	9.725 0	Sma-usc35	0.036 8	6.541 9
Smac09	0.112 6	1.969 4	Sma-usc36	0.118 8	1.853 8
Smac10	0.264 5	0.695 1	Mean	0.111 7	1.932 7
Smac12	0.088 1	2.588 7			

表5 大菱鲆引进4个不同地理群体各群体间配对比较的 $F_{st}$ 值

Table 5 Genetic diversity coefficient( $F_{st}$ ) between the four imported geographical stocks of turbot *S. maximus*

群体 Stock	挪威 Norway	丹麦 Denmark	法国 France	英国 UK
挪威 Norway	—	—	—	—
丹麦 Denmark	0.086 1	—	—	—
法国 France	0.084 3	0.109 5	—	—
英国 UK	0.079 2	0.085 8	0.033 3	—

表6 遗传相似性系数及距离

Table 6 Nei's unbiased measures of genetic identity ( $I$ ) and genetic distance ( $D$ )

群体 Stock	挪威 Norway	丹麦 Denmark	法国 France	英国 UK
挪威 Norway	—	0.847 3	0.787 6	0.809 1
丹麦 Denmark	0.165 7	—	0.795 0	0.852 0
法国 France	0.238 8	0.229 5	—	0.933 3
英国 UK	0.211 8	0.160 2	0.069 1	—

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 the genetic identity

根据各群体之间的遗传距离,对4个地理群体进行聚类(图2)。4个群体主要分为两类,挪威和丹麦聚为一类,法国和英国聚为一类。

## 2.3 Hardy-Weinberg 平衡

对12个微卫星位点的等位基因频率与Hardy-Weinberg平衡的 $\chi^2$ 显著性检验( $P$ )与各位点遗传偏离指数( $d$ ),结果见表7。

4个群体中偏离Hardy-Weinberg平衡的位点,挪威群体有7个;丹麦群体有6个;法国群体有10个;英国

群体有 8 个。挪威群体表现出杂合子缺失的位点较多,有 7 个,丹麦群体和英国群体均有 4 个位点表现出杂合子缺失现象,法国群体表现出杂合子缺失的位点较少,有 3 个。

### 3 讨论

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)。群体内和群体间的遗传多样性从长期来看被认为是决定该物种进化和适应性,短期来看是用来加强个体的适应性(Hedrick *et al.* 1992; Thorpe *et al.* 1995)。本研究所使用的 12 对微卫星分子标记中,5 个位点呈高度多态性,7 个位点呈中度多态性,总体表现为较好的多态性,可以用于遗传结构和系谱分析。在 4 个群体中平均 *PIC* 由小到大依次为丹麦群体(0.340 8)、英国群体(0.472 7)、法国群体(0.485 4)、挪威群体(0.487 3),各群体均表现为中度多态性,表明这 4 个地理群体种群内遗传变异中等。

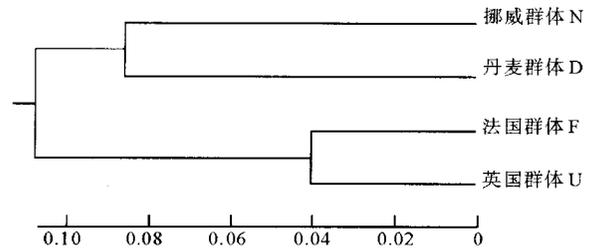


图 2 大菱鲆引进 4 个地理群体的 UPGMA 聚类  
Fig. 2 UPGMA cluster analysis of the four imported geographical stocks of turbot *S. maximus*

表 7  $\chi^2$  显著性检验 (*P*) 与遗传偏离指数 (*d*)

Table 7 Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium and heterozygote deficiency or excess

位点 Locus	挪威 Norway		丹麦 Denmark		法国 France		英国 UK	
	<i>P</i>	<i>d</i>	<i>P</i>	<i>d</i>	<i>P</i>	<i>d</i>	<i>P</i>	<i>d</i>
Smac-1	0.354 430	-0.418 4	0.031 203*	0.463 8	0.752 433	-0.101 9	0.355 246	-0.104 5
Smac-2	0.000 000**	1.000 0	1	—	0.000 003**	1.000 0	0.000 001**	1.000 0
Smac-3	0.300 363	-0.250 0	0.006 355**	0.569 9	0.033 659*	-0.054 8	0.005 397**	0.596 0
Smac-6	0.000 035**	0.897 7	0.210 373	0.253 3	0.000 035**	0.897 7	0.730 070	-0.102 8
Smac-9	0.001 924**	0.553 6	0.000 003**	1.000 0	0.016 836*	-0.615 2	0.823 197	-0.113 3
Smac-10	0.593 786	-0.139 2	0.160 924	-0.333 3	0.561 052	0.201 6	0.000 007**	0.259 3
Smac-12	0.052 504	-0.129 0	0.154 764	-0.076 6	0.013 806*	0.135 1	0.000 000**	0.586 9
smausc-12	0.000 000**	0.861 4	0.000 000**	0.727 4	0.005 216**	-0.302 0	0.000 000**	0.858 4
smausc-25	0.000 000**	0.439 6	0.000 004**	0.685 0	0.000 000**	0.694 7	0.000 000**	0.429 5
smausc-34	0.000 000**	0.712 2	0.039 898*	-0.481 5	0.000 584**	0.269 4	0.001 894**	0.262 0
smausc-35	0.266 614	-0.209 1	0.160 924	-0.333 3	0.000 000**	0.337 0	0.688 987	-0.228 7
smausc-36	0.000 000**	0.831 9	1	—	0.000 000**	0.548 9	0.000 000**	0.717 6

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

遗传杂合度又称基因多样性,反映各群体在几个位点上的遗传变异,认为它是度量群体遗传变异的一个最合适参数(Nei *et al.* 1975)。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,群体处于遗传平衡状态。Bouza 等(2002)检测到野生群体的无偏杂合度期望值(0.77)明显高于养殖群体(0.68)。Stefánsson 等(2001)也检测到养殖群体与距离最近的野生群体之间无偏杂合度期望值存在较大差异。本研究中 4 个群体的平均无偏倚杂合度期望值由小到大为:丹麦群体(0.412 0)、英国群体(0.544 8)、法国群体(0.561 1)、挪威群体(0.565 8)。对各群体各位点的无偏倚杂合度期望值运用 SPSS 软件进行 Kruskal-Wallis 检验,其结果( $H=4.438, df=3, P=0.218$ )没有达到统计学的显著水平,表明各群体的遗传多样性程度尚处于同一水平。多态信息含量(*PIC*)和杂合度(*H*)是衡量群体内遗传变异的指标,其值直接反映群体内个体的均匀度,数值高则遗传变异大,反之则变异小(廖信军等 2006)。本研究结果表明 4 个地理群体内的遗传多样性较好,各群体间具有一定的遗传分化。

遗传分化指数( $F_s$ )是衡量群体间遗传分化程度的重要指标,其值在 0~1 之间,数值越大表明群体间存在

的遗传分化越大。Coughlan 等(1998)利用3个微卫星位点对爱尔兰和挪威的野生与养殖大菱鲂群体进行了比较,挪威的野生群体和爱尔兰的野生群体之间分化程度最低( $F_{st}=0.009$ ),挪威的养殖群体和爱尔兰的养殖群体之间遗传分化程度最高( $F_{st}=0.037$ );Coughlan 等(1998)认为造成这一现象的原因是产卵场内等位基因的自由交换和养殖群体人工选择。Bouza 等(2002)用同工酶和微卫星标记分析两个野生大菱鲂群体,表明群体之间遗传变异较小,遗传分化主要来自群体内个体之间。Nielsen 等(2004)用8个微卫星位点对从比斯开湾到波罗的海范围内8个不同地理位置的大菱鲂进行了遗传结构分析也得到遗传分化主要来自群体内个体之间,两两间比较遗传分化指数( $F_{st}$ )最大值为0.032(北海和波罗的海北部两个群体之间)。申雪艳等(2004)利用RAPD引物和4对微卫星引物对大菱鲂引进3个地理群体进行分析,得遗传分化系数( $G_s$ )在0.0332~0.0673之间。本研究中由遗传分化指数( $F_{st}$ )和基因流( $N_m$ )可知,英国群体与法国群体间的遗传分化程度最低,法国群体与丹麦群体之间的分化程度最高。各群体的平均遗传分化系数为0.1117,表明变异有11.17%来自群体之间,88.83%来自群体内个体之间,遗传变异主要来自群体内个体之间,这与Bouza 等(2002)和Nielsen 等(2004)的研究结果一致。

群体间的遗传关系可由所有微卫星位点上的所有等位基因的接近程度来衡量,遗传距离可准确体现这种程度的大小。遗传距离是研究物种遗传多样性的基础,它反映了所研究群体的系统分化。一般认为,群体分化时间越短,遗传距离越小。Blanquer 等(1992)用同工酶技术得出不同地理群体间的遗传距离仅为 $0.002 < D < 0.003$ ;邹曙明等(2001)对乳山养殖场从英国引进大菱鲂人工繁殖的第一代进行RAPD分析,结果表明,遗传距离 $D=0.045$ ;申雪艳等(2004)利用RAPD引物和4对微卫星引物对从法国、英国、西班牙引进的3个大菱鲂群体进行分析做出的遗传距离分别为0.0124~0.0192和0.0682~0.1205。本研究中得到各群体间的遗传距离为0.0691~0.2388。作者分析,由于较同工酶和RAPD方法微卫星标记具有更高的多态性(Tautz 1989; Weber *et al.* 1989; Jeffreys *et al.* 1988; Hamada *et al.* 1982),申雪艳等(2004)利用同一批样品实验结果微卫星标记分析出的遗传距离明显高于用RAPD方法得出的结论,所以本实验得到的遗传距离要高于Blanquer 等(1992)、邹曙明等(2001)、申雪艳等(2004)得到的结果。申雪艳等(2004)用微卫星标记得到的遗传距离为0.0682,与本研究中得到的英国、法国两群体之间的遗传距离为0.0691极为相近,进一步验证了英国、法国两个群体之间遗传距离是小的。

Crawford 等(1998)曾指出若要保存尽量多的遗传多样性,必须有可靠的方法对品种间的遗传分化进行测定,微卫星等位基因频率的分析是目前最佳的方法之一,由微卫星得出的遗传距离更能反映分化时间的长短,以及品种间的遗传变异和分化。本研究所利用的微卫星位点多态信息含量较好,对大菱鲂引进4个地理群体用UPGMA法所得到的聚类结果与马爱军等(2008)用数量遗传学方法得到的结果一致,且基本符合4个地理群体的地域分布。本实验反映出各群体之间存在一定的遗传分化,各群体内部遗传多样性较好,存在一定的育种潜力,适于作为大规模家系选育的基础群体。本实验也为以后大菱鲂的遗传育种以及引种工作提供了技术参数,尽量同时引进遗传关系较远的群体(如挪威群体和法国群体),选择具有一定遗传分化的群体之间进行交配,以取得优势群体。

## 参 考 文 献

- 马爱军,陈四清,雷霖霖,胡建成,孙宗哲,贺知德. 2000. 大菱鲂幼鱼几种饲料的分析与对比实验. 饲料工业,21(7): 17~19
- 马爱军,王新安,雷霖霖,杨志,曲江波,许可. 2008. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)四个不同地理群体数量形态特征比较. 海洋与湖沼,39(1): 24~29
- 申雪艳,宫庆礼,雷霖霖,孔杰,翟介明,李波. 2004. 进口大菱鲂 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析. 海洋与湖沼,35(4): 332~341
- 邹曙明,李思发,蔡完其. 2001. 牙鲆和大菱鲂养殖群体的分子标记和遗传变异. 中国水产科学,7(4): 77~84
- 萨姆布鲁, J., 弗里奇, E. F., 曼尼阿蒂斯, T. 1992. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 463~469
- 雷霖霖. 1983. 英国养殖大菱鲂简况. 水产科技情报, 2: 26~27
- 雷霖霖. 2000. 海水养殖新品种介绍——大菱鲂. 中国水产, 4: 89~92

- 雷霖霖. 2001. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)引进与驯养试验. 中国动物科学研究, 2: 408~413
- 雷霖霖, 马爱军, 陈超, 庄志猛. 2005. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)养殖现状与可持续发展. 中国工程科学, 7(5): 30~34
- 廖信军, 常洪, 孙伟, 王冬蕾. 2006. 利用微卫星标记对六个羊群体性的研究. 家畜生态学报, 27(2): 13~18
- Aljanabi, S. M., and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25(22): 4 692~4 693
- Allendorf, F. W., and Ryman, N. 1987. Genetic management of hatchery stock. Population genetics and fishery management Seattle: University of Washington Press, 141~159
- Blanquer, A., and Alayse, J. P. 1992. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus maximus*) (Osteichthyes, Pleuronectiformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. Fish Biology, 41(5): 725~736
- Botstein, D., and White, R. L. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Anim. Genet. 32: 314~331
- Bouza, C., Presa, P., Castro, J., Sánchez, L., and Martínez, P. 2002. Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. Canadian Fisheries and Aquatic Sciences, 59: 1 460~1 473
- Chen, S. L., Ma, H. Y., Jiang, Y., Liao, X. L., and Meng, L. 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from an EST library of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross-species amplification. Molecular Ecology Notes, 7(5): 848~850
- Coughlan, J. P., Imsland, A. K., and Galvin, P. T. 1998. Microsatellites DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: A preliminary study. Fish Biology, 52: 916~922
- Crawford, A. M., and Littlejohn, R. P. 1998. The use of DNA marker in deciding conservation priorities in sheep and other livestock. Animal Genetic Resources Information, 23: 21~26
- Crow, J. F., and Kimura, M. 1965. Evolution in sexual and asexual population. The American Naturalist, 99: 439~450
- Hamada, H., Petrino, M. G., and Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Biochemistry, 79(21): 6 465~6 469
- Hedrick, P. W., and Miller, P. S. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. Ecological Applications, 2: 30~46
- Jeffreys, A. J., Royle, N. J., Wilson, V., and Wong, Z. 1988. Spontaneous mutation rate to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. Nature, 332: 278~281
- Levene, H. 1949. On a matching problem in genetics. Ann. Math. Stat. 20: 91~94
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 79~124
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583~590
- Nei, M., Maruyama, T., and Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 29: 1~10
- Nielsen, E. E., Nielsen, P. H., Meldrup, D., and Hansen, M. M. 2004. Genetic population structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) supports the presence of multiple hybrid zones for marine fishes in the transition zone between the Baltic Sea and the North Sea. Mol. Ecol. 13: 585~595
- Pardo, B. G., Hermida, M., Fernández, C., Bouza, C., Pèrez, M., Lavona, A. L., Sánchez, L., and Martínez, P. 2006. A set of highly polymorphic microsatellites useful for kinship and population analysis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture Research, 37: 1 578~1 582
- Stefánsson, M., Coughlan, J., FitzGerald, R. D., and Cross, T. F. 2001. Microsatellite DNA variation in reared strains of turbot (*Scophthalmus maximus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) compared with wild samples. ICES CM 2001/L: 16. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/2001/L/L1601.pdf>
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA marker. Nucleic Acids Research, 17(16): 6 463~6 447
- Thorpe, J. P., and Smart, J. 1995. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: Global Biodiversity Assessment-Heywood V. H., Cambridge: Cambridge University Press
- Wright, S. 1978. Variability within and among natural populations. Chicago, University of Chicago Press
- Weber, J. L., and May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44(3): 388~396