

DOI: 10.12264/JFSC2024-0019

膨腹海马养殖群体遗传多样性

郑乐云², 韦丽云¹, 闫旭¹, 卢柯宇¹, 张敏琳¹, 梁建韬¹, 梁凯珊¹, 何丽斌³, 甘松永⁴, 吴锦辉⁴, 王庆¹

1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361102;

3. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012;

4. 广东省海洋渔业实验中心, 广东 惠州 529699

摘要: 为了解我国主要养殖的 4 个膨腹海马(*Hippocampus abdominalis*)群体[山东第三代群体(SD)、福建第一代群体(FJ1)、福建第六代群体(FJ6)、台湾第十二代群体(TW)]和 1 个澳大利亚野生种繁育子代(AS)的遗传结构, 开发了 6 个具有多态性的膨腹海马微卫星标记, 并利用这 6 个微卫星标记对 5 个群体的膨腹海马群体进行了遗传分析, 结果发现 6 对引物在 144 个样本个体中共检测出 63 个等位基因位点, 等位基因数目在 8~14 之间, 平均为 10.5, 且 $PIC > 0.25$, 表明 6 个微卫星位点都具有较高的多态性。此外, 探索发现 5 个群体的观测杂合度和期望杂合度均值分别为 0.6603 和 0.8104, 表明 5 个群体遗传多样性较丰富。进一步, 通过分子方差分析和遗传分析可知 5 个群体的遗传变异主要来自种群内, 各个群体间保持着较高水平的遗传距离, 其中台湾(TW)和福建(FJ1)群体之间的遗传距离最大, 为 0.4529。综上结果表明, 5 个膨腹海马养殖群体之间存在遗传差异且群体的遗传多样性较丰富, 没有出现遗传多样性降低情况, 这些膨腹海马群体可继续用作后续的繁育工作。

关键词: 膨腹海马; 微卫星标记; 遗传分析; 期望杂合度; 遗传结构

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)05-0537-09

海马(*Hippocampus* spp.)是一种小型的海洋鱼类, 属于海龙科小型硬骨鱼, 因特殊的体型而得名。膨腹海马(*Hippocampus abdominalis*)又称大肚海马, 为辐鳍亚纲(Actinopterygii), 海龙目(Syngnathiformes), 海龙科(Syngnathidae), 海马属(*Hippocampus*), 是所有已知海马种类中最大的一种。膨腹海马主要分布在西南太平洋区的澳大利亚及新西兰, 栖息在浅海珊瑚礁和藻类丰富的海域^[1], 主要以小型浮游生物为食^[2]。

海马是中国水产经济中重要的高价值海水鱼类, 作为一种传统药材, 具有极高的药用价值,

一度被誉为“南方人参”^[3], 以海马为原料所开发的药品已达数十种, 可见我国原材料海马的市场需求量较大^[4]。此外, 海马也是我国二级保护动物, 近年来, 海马逐渐成为水族爱好者的观赏品种, 逐渐频繁地走进大众视野^[5]。海马因其较高的营养、药用和观赏性价值获得了人们的广泛认可, 并且市场需求旺盛, 人工养殖前景广阔。

近年来, 随着海洋生态环境的变化、近海污染的加剧和人类活动的增加, 膨腹海马的数量和分布受到了严重的影响, 野生物种已经濒危。为保护海马资源、满足市场需求, 海马的人工养殖

收稿日期: 2024-01-24; 修订日期: 2024-03-26.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400502); 厦门市科技计划项目(2021FCX012501180007); 广东省自然科学基金面上项目(2022A1515012505).

作者简介: 郑乐云(1969–), 男, 教授, 研究方向为海水鱼类养殖及遗传育种. E-mail: 981668817@qq.com

通信作者: 王庆, 副教授, 研究方向为鱼类抗病机制及遗传育种. E-mail: wangqing@scau.edu.cn

繁育已经成为了唯一的选择^[6]。随着自然环境的恶化和人工繁育代数的增加,海马的遗传多样性可能出现了退化。物种遗传多样性是生物多样性的关键组成部分,它涉及到地球上数百万种不同物种的生存和繁衍。但随着时间的变化,物种的遗传多样性会因为近亲繁殖和遗传漂变而降低,从而导致该物种丧失环境适应能力和抗病力降低,所以物种拥有高水平的遗传多样性具有非常重要的意义^[7]。因此,探索和保护膨腹海马物种遗传多样性具有重要意义。

SSR (simple sequence repeats, 简单序列重复) 标记是近年来发展起来的一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术,也称为微卫星 DNA (microsatellite DNA),为 1~6 个碱基串联重复序列^[8],微卫星标记广泛分布于基因组中,并且不受环境影响,具有中性、共显性、高度的多态性和跨基因组的随机分布等特性,广泛应用于水产动物的遗传结构分析、种质评价及亲子鉴定等研究^[9-11]。为了解不同地区膨腹海马养殖群体的遗传多样性,本研究基于本实验室先前转录组结果,选取了 6 个微卫星位点进行鉴定,并对不同地区(中国山东、中国福建、中国台湾以及澳大利亚)的 5 个膨腹海马养殖群体进行遗传多样性分析,以期为膨腹海马养殖群体的遗传资源保护和种质开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的膨腹海马群体为中国山东繁育第三代群体(SD)、福建繁育第一代群体(FJ1)、福建繁育第六代群体(FJ6)、台湾繁育第十二代群体(TW)以及澳大利亚野生群体繁育的子代(AS),其中 SD、FJ 和 TW 都是引进自 AS 群体的不同子代,5 个群体的地理位置如图 1a 所示。对 5 个群体的膨腹海马分别取其背部肌肉适量,其中 SD、FJ1、FJ6、TW 养殖群体各取 30 个样品,AS 养殖群体取数 24 个样品,共 144 个肌肉样品,于-80 ℃保存备用

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用基因组 DNA 提

取试剂盒(北京金沙生物技术有限公司)提取每个样品的 DNA,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,微量分光光度计测其浓度,-20 ℃保存备用。

1.2.2 微卫星引物的来源与筛选 根据本实验室前期开展的膨腹海马转录组测序得到 SSR 序列,使用 Primer6.0 软件设计引物并进行 PCR 扩增,所有 F 引物的 5'端合成荧光修饰引物,选用 FAM、HEX、TAMRA、ROX 4 种荧光修饰;R 引物合成 PAGE 引物,由北京擎科生物科技有限公司合成。用最后扩增良好的荧光 PCR 产物进行 3730xl 测序仪检测用软件 Gene mapper 4.1 对检测数据进行分析,根据分析结果,判断不同引物是否具体片段多态性,最后获得 6 对符合条件的引物(表 1)。

表 1 筛选出的引物信息		
Tab. 1 Selected primer information		
引物名 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物长度/bp product length
HM1	F: TGTGTTTCGGTCAAGCCTTTC	201
	R: GGACAAGCAAGACTTCTAAG	
HM2	F: TAGTTGAGGACCACTGGAGT	185
	R: CAGTGAAACTCCTCTACAACG	
HM4	F: TGTTAAGACCGAATGGCTGT	276
	R: CCAGTGTCTCTGCTTGCTCT	
HM6	F: GCTAAGTCACTGCTGAGTGT	215
	R: CCTCTTTGAGGACGAAGAC	
HM7	F: TCTCACTGTCAATTCCTGTG	187
	R: TGATGTAGTCCATGCAGACG	
HM8	F: TAACCTGGCTAAGTGAGCA	230
	R: GTGTCATCTATGCAAGAGGAC	

1.2.3 PCR 扩增 用合成的引物进行扩增,以擎科金牌 Mix (green)进行 PCR 扩增,扩增体系为 20 μL,各组分如下: 金牌 Mix (green) 17 μL、10 μmol/L Primer F (加接头) 1 μL、10 μmol/L Primer R 1 μL、Template (gDNA) 1 mL。PCR 扩增程序: 98 ℃预变性 2 min; 98 ℃ 10 s, 各引物特异性退火温度(表 1) 10 s, 72 ℃ 10 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。将扩增好的 PCR 产物进行

琼脂糖凝胶电泳进行检测。用最后扩增良好的荧光 PCR 产物进行 3730xl 测序仪检测, 得到的数据使用 Genemapper 软件进行分析。

1.2.4 数据分析 SSR 位点和群体的各项遗传多样性指标分别在 Popgen32 和 GenAlEx 6.501 版软件中, 分别计算 SSR 位点和群体的各项遗传多样性指标, 包括观测等位基因(N_a)、有效等位基因(N_e)、香农指数(I)、多态性信息指数(PIC)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、主要等位基因频率(MP)和近交系数(F_{is})。本研究的种群遗传结构基于贝叶斯模型的群体聚类方法, 在 Structure 2.3.3 版软件中进行, 采用马尔科夫链蒙特卡洛(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)方法, 预设群体分组(K)的同时根据等位基因频率对个体进行计算、抽样和分组。设置 K 值的数据范围为 1~10, 每个 K 值进行 10 次独立的 runs, 每个循环的重复抽样次数设置为 100000 次。最后, 在 STRUCTURE HARVESTER 网站中, 根据 Evanno

等^[12]的方法, 计算出最适的 K 值。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点多态性

本研究所采用的 6 对微卫星引物在 144 个样本个体中共检测出 63 个等位基因位点。其中, 最小等位基因数目为 8, 最大等位基因数目为 14, 平均等位基因数为 10.5。有效等位基因总数为 33.9425。平均位点有效等位基因数为 5.6571。香农指数的数值范围 1.5481~2.2957, 平均值为 1.8678。观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)的数值范围分别为 0.4861~0.8194 和 0.7185~0.8865, 均值分别为 0.6603 和 0.8104。近交系数平均值为 0.1201, 数值为-0.0443~0.2984。多态性信息指数(PIC)的数值范围为 0.6847~0.8725, 平均值 0.7834, 6 对引物均具有较高的多态信息(PIC>0.25)(表 2)。综上, 本实验开发的 6 对引物的多态性较高。

表 2 6 对 SSR 引物的多态性
Tab. 2 Polymorphism of 6 pairs of SSR primers

locus 位点	N_a	N_e	I	PIC	H_o	H_e	PHWE
HM1	8	5.5725	1.8048	0.7963	0.7246	0.8235	0.0147*
HM2	10	6.5465	1.9792	0.8287	0.8194	0.8502	0.0328*
HM4	10	5.6533	1.9553	0.8035	0.6715	0.8261	0.0000***
HM6	10	3.5208	1.5481	0.6847	0.6389	0.7185	0.1123 ns
HM7	11	4.0755	1.6236	0.7144	0.4861	0.7573	0.0000***
HM8	14	8.5739	2.2957	0.8725	0.6214	0.8865	0.0000***
mean	10.5000	5.6571	1.8678	0.7834	0.6603	0.8104	0.0266
St. Dev	1.9748	1.8095	0.2717		0.1113	0.0618	

注: N_a , 观测等位基因, N_e , 有效等位基因, I , 香农指数, PIC, 多态信息指数, H_o , 观测杂合度, H_e , 期望杂合度, PHWE, 哈迪温伯格平衡。
*, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, ns, $P>0.05$ 。
Note: N_a , observed allele, N_e , effective allele, I , Shannon index, PIC, polymorphic information index, H_o , observed heterozygosity, H_e , expected heterozygosity, PHWE, Hardy Weinberg equilibrium. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, ns, $P>0.05$ 。

对来自 5 个地区的 144 个膨腹海马个体进行基因分型, 在 6 个微卫星位点确定了 203 个等位基因(表 3), 所有 6 个微卫星的等位基因数范围为 5~11, 平均等位基因数为 6.7999。

2.2 遗传分化分析

为了解不同群体间遗传关系, 在 Popgen 32 中计算了群体间的遗传距离。结果如表 4 所示, 5

个群体中 FJ1 和 FJ6 间的遗传距离最小, 为 0.0461; FJ1 和 TW 间的遗传距离最大, 为 0.4529, 遗传距离分析表明, 5 地理群体之间的遗传距离都明显高于 2%, 说明产生了群体间遗传分化。此外, 笔者构建了群体的 UPGMA 树(图 1), 由图可知, 5 个地理群体聚类为 2 个进化分支, 福建、山东和澳大利亚聚为一支, 而台湾地区的单独聚为一支。

表 3 5 个膨腹海马种群的引物多态性
Tab. 3 Primer polymorphism in 5 *Hippocampus abdominalis* populations

sample 样品	sample size 样品数量	指数 parameter	位点 locus						均值 mean
			HM1	HM2	HM4	HM6	HM7	HM8	
SD	30	<i>A</i>	6	6	7	6	6	8	6.5000
		<i>A_t</i>	4.7020	3.8877	4.0833	2.3684	3.5156	5.0637	3.9368
		<i>H_e</i>	0.8041	0.7554	0.7688	0.5876	0.7277	0.8183	0.7436
		<i>H_o</i>	0.8750	0.8667	0.8929	0.4333	0.7667	0.8077	0.7737
		<i>F_{is}</i>	−0.1114	−0.1668	−0.1824	0.2500	−0.0714	−0.0065	−0.0481
		<i>P</i>	0.0007	0.0021	0.0382	0.0007	0.0000	0.0000	0.0070
FJ1	30	<i>A</i>	6	7	7	5	6	10	6.8333
		<i>A_t</i>	5.2023	5.7692	5.3060	4.2056	3.0405	5.3097	4.8056
		<i>H_e</i>	0.8215	0.8407	0.8258	0.7751	0.6825	0.8254	0.7952
		<i>H_o</i>	0.8333	0.8333	0.7241	0.7333	0.2000	0.5000	0.6374
		<i>F_{is}</i>	−0.0316	−0.0081	0.1077	0.0379	0.7020	0.3840	0.1987
		<i>P</i>	0.5767	0.9629	0.0000	0.0652	0.0000	0.0000	0.2675
FJ6	30	<i>A</i>	6	7	8	5	7	9	7.0000
		<i>A_t</i>	4.8649	5.5901	4.4039	4.2056	3.2550	5.6604	4.6633
		<i>H_e</i>	0.8079	0.8350	0.7881	0.7751	0.7045	0.8373	0.7913
		<i>H_o</i>	0.8000	0.8667	0.5000	0.7667	0.4667	0.5667	0.6611
		<i>F_{is}</i>	−0.0070	−0.0555	0.3531	−0.0058	0.3264	0.3117	0.1538
		<i>P</i>	0.5325	0.3182	0.0461	0.1106	0.0004	0.0000	0.1680
TW	30	<i>A</i>	6	7	7	6	7	11	7.3333
		<i>A_t</i>	5.0562	5.0279	5.1873	4.0089	4.0449	5.7325	4.8430
		<i>H_e</i>	0.8158	0.8147	0.8209	0.7633	0.7655	0.8395	0.8033
		<i>H_o</i>	0.7333	0.7333	0.5667	0.7000	0.5333	0.7000	0.6611
		<i>F_{is}</i>	0.0859	0.0846	0.2980	0.0674	0.2915	0.1521	0.1633
		<i>P</i>	0.0537	0.5989	0.0000	0.2544	0.0000	0.0000	0.1512
AS	24	<i>A</i>	5	6	7	6	5	9	6.3333
		<i>A_t</i>	2.3226	3.6571	3.6456	1.9794	2.6605	5.2364	3.2503
		<i>H_e</i>	0.5816	0.7420	0.7411	0.5053	0.6374	0.8262	0.6723
		<i>H_o</i>	0.3333	0.7917	0.6667	0.5417	0.4583	0.5417	0.5556
		<i>F_{is}</i>	0.4146	−0.0896	0.0813	−0.0947	0.2656	0.3305	0.1513
		<i>P</i>	0.0000	0.0001	0.0018	0.9947	0.0000	0.0000	0.1661

注: *A*, 等位基因数; *A_t*, 等位基因丰富度; *H_e*, 预期杂合度; *H_o*, 观察杂合度; *F_{is}*, 近亲繁殖系数; *P*, HWE *P* 值; *, 连续 Bonferroni 校正后明显偏离 HWE.

Note: *A*, number of alleles; *A_t*, allele richness; *H_e*, expected heterozygosity; *H_o*, observe heterozygosity; *F_{is}*, inbreeding coefficient; *P*, HWE *P*-value; *, after continuous Bonferroni correction, there is a significant deviation from HWE.

表 4 5 个膨腹海马群体间的遗传相似性(上三角)
和遗传距离(下三角)

Tab. 4 Genetic identity (upper triangle) and genetic distance (lower triangle) between 5 *Hippocampus abdominalis* populations

群体名称 population ID	SD	FJ1	FJ6	TW	AS
SD		0.7522	0.7130	0.7057	0.7535
FJ1	0.2847		0.9550	0.6358	0.7423
FJ6	0.3382	0.0461		0.6480	0.6790
TW	0.3486	0.4529	0.4339		0.6602
AS	0.2830	0.2980	0.3871	0.4151	

从分子方差分析(AMOVA)结果可知(如表 5), 种群内遗传变异较大, 占变异总量的 89%, 种群间的遗传变异仅占 11%, 说明了在种群间基因流动非常快, 从而变异不大, PCoA 结果也表明 5 个群体间的遗传变异较小(图 2), 由此可见种群的遗传变异主要来自群体内。在 STRUCTURE (2.3.3 版本)软件中基于贝叶斯模型的群体聚类方法, 计算得出 5 个群体的最适 *delta K* 值为 2 (图 3), 表明了 5 个种群中有 2 个基因库的存在。由图 4 可知, 当 *K*=2 时, SD 和 TW 这两个种群的基因组成

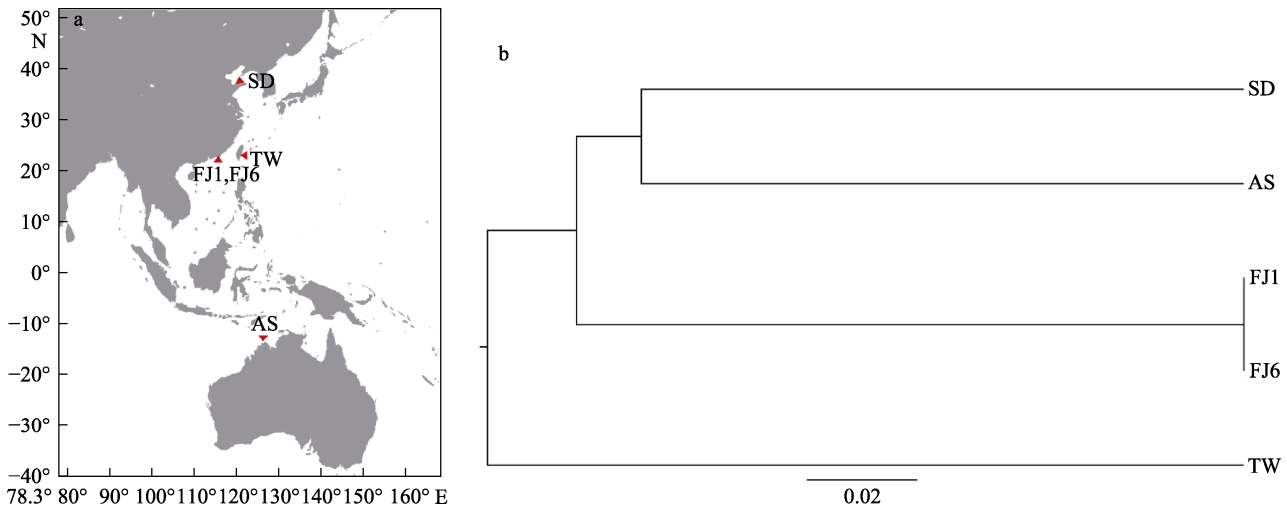


图 1 5 个膨腹海马种群的地理位置及 UPGMA 聚类结果

a. 样品采集位置信息, SD: 山东第三代群体; FJ1: 福建第一代群体; FJ6: 福建第六代群体; TW: 台湾第十二代群体; AS: 澳大利亚野生群体繁育的子代. b. 群体聚类结构分析.

Fig. 1 The sampling locations and UPGMA clustering results of 5 *Hippocampus abdominalis* populations

a. Sampling locations. SD: the third cultured stock in Shangdong Province; FJ1: the first cultured stock in Fujian Province.; FJ6: the sixth cultured stock in Fujian Province; TW: the twelfth cultured stock in Taiwan Province; AS: the offspring of wild population breeding in Australia. b. UPGMA clustering results of 5 populations.

表 5 5 个膨腹海马种群 AMOVA 分析
Tab. 5 AMOVA analysis in 5 *Hippocampus abdominalis* populations

source	df	SS	MS	Est. Var.	%
among pops	4	97.829	24.457	0.664	11
within pops	139	747.983	5.381	5.381	89
total	143	845.813		6.045	100

注: source, 变异来源; df, 自由度; SS, 平方和; Est. Var., 方差分量; %, 变异百分比; among pops, 群体间; within pops, 群体内.
Note: source, source of variation; df, degrees of freedom; SS, sum of squares; Est Var., variance component; %, variation percentage; among pops, between groups; within pops, within a group.

主要来源于基因库 2, FJ1、FJ6 和 AS 这 3 这种群的基因组成主要来源于基因库 1 和 2。

3 讨论

SSR 广泛存在于真核生物和原核生物基因组中^[13], 已广泛应用于谱系鉴定、亲缘关系检测、遗传多样性分析、种质资源评价、遗传图谱构建及基因定位等领域^[14-15]。目前, SSR 已广泛应用于哺乳动物的遗传分析中^[11], 近年来 SSR 也广泛应用于比较水生物种群体内和群体间的遗传多样性关系的相关研究中^[16-18]。海马具有抗血栓、抗衰

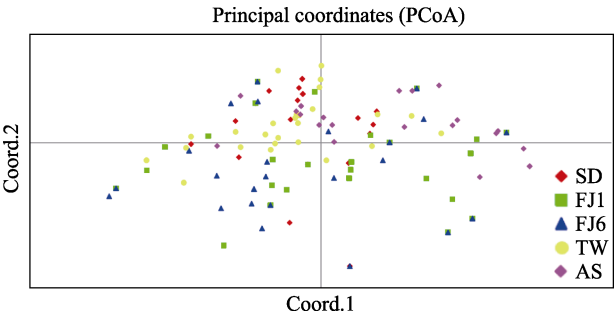


图 2 144 个膨腹海马样品的 PCoA 结果

SD: 山东第三代群体; FJ1: 福建第一代群体; FJ6: 福建第六代群体; TW: 台湾第十二代群体; AS: 澳大利亚野生群体繁育的子代.

Fig. 2 PCoA results of 144 *Hippocampus abdominalis* samples

SD: the third cultured stock in Shangdong Province; FJ1: the first cultured stock in Fujian Province.; FJ6: the sixth cultured stock in Fujian Province; TW: the twelfth cultured stock in Taiwan Province; AS: the offspring of wild population breeding in Australia.

老等多种药用功能, 是一种经济价值较高的名贵海产中药材^[19], 近年来, 我国海马养殖产业发展迅速, 目前我国海马人工养殖规模已达到世界第一, 养殖技术也达到了领先水平^[20]。但鱼类养殖过程中容易出现互相混杂和近交衰退等现象^[21],

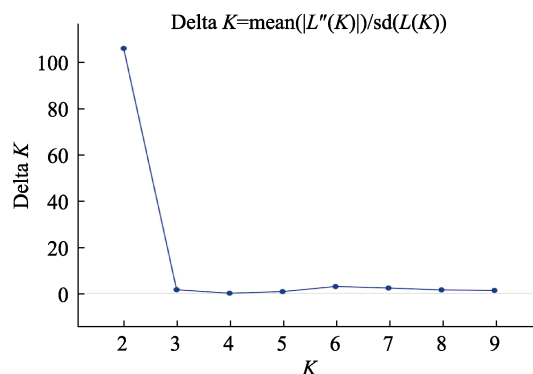


图 3 Structure 分析的 ΔK 方法绘制的 K 值变动图

Fig. 3 Structure analysis ΔK -value variation chart drawn by K -method

影响海马养殖群体的遗传多样性, 因此本研究通过微卫星标记探索我国主要养殖地区膨腹海马养殖群体间的遗传多样性, 以评估现有养殖群体的遗传多样性是否丰富, 为膨腹海马的种质保存和

繁育提供参考。

多态信息含量能够反映出某一群体中出现多态性的程度^[22], 可以用于评估遗传标记的变异程度和遗传多样性。本研究筛选出 6 个多态性 SSR 位点, 分析了 5 个养殖群体之间的遗传关系。开发的 6 对微卫星位点在 144 个样本个体中共检测出 63 个等位基因位点, 等位基因数目的范围在 8~14 之间, 在群体等位基因数目分析中发现, AS 群体的平均等位基因数目最少(平均 6.333 个), 这可能与 AS 群体样本在养殖环境中存在人工选择作用相关。同时在本研究中发现 6 个微卫星位点都具有高水平的多态性($PIC > 0.25$), 该研究结果与唇裸重唇鱼^[10]和大口黑鲈^[23]等相关的水生动物的研究结果相近, 这表明本研究筛选的 6 个微卫星标记可作为膨腹海马养殖群体遗传多样性及遗传结构分析的良好评价工具。

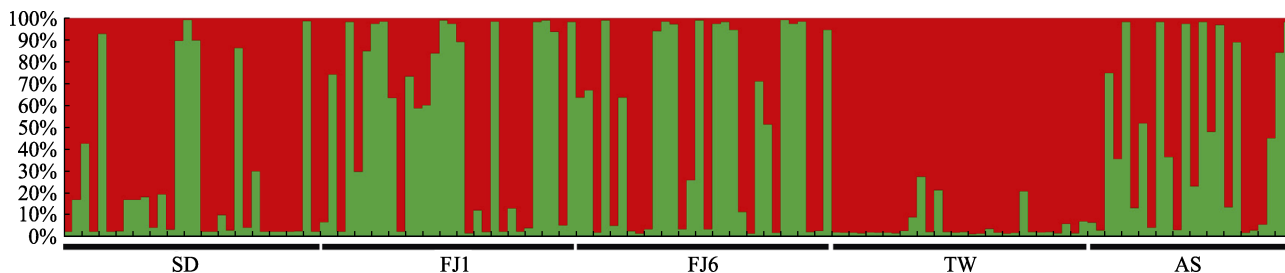


图 4 $K=2$ 时 144 个样品的 Structure 结果

不同颜色代表不同基因库; SD 山东第三代群体; FJ1: 福建第一代群体; FJ6: 福建第六代群体; TW: 台湾第十二代群体; AS: 澳大利亚野生群体繁育的子代。

Fig. 4 Structure results of 144 samples at $K=2$

different colors represent different gene pools; SD: the third cultured stock in Shangdong Province; FJ1: the first cultured stock in Fujian Province.; FJ6: the sixth cultured stock in Fujian Province; TW: the twelfth cultured stock in Taiwan Province; AS: the offspring of wild population breeding in Australia.

观测杂合度和期望杂合度是遗传学中用于衡量遗传变异或基因座位多样性的重要参数^[24], 可以用于评估遗传资源的多样性。在生物种群中, 遗传多样性是维持物种生存和进化的基础。期望杂合度和观测杂合度越高, 说明该基因座位的遗传变异越丰富, 物种的遗传资源越丰富。这对于保护物种、育种研究和生物进化研究具有重要的意义。DeWoody 等^[25]基于微卫星标记对 13 种淡水鱼类的遗传多样性进行了研究, 结果显示, 13 种鱼类的期望杂合度平均值为 0.4600, 认为其遗传多样性较丰富。本研究开发的 6 个微卫星位点

在 144 个样品中测出的测杂合度和期望杂合度的数值范围分别为 0.4861~0.8194 和 0.7185~0.8865, 均值分别为 0.6603 和 0.8104, 本研究中遗传多样性参数高于 DeWoody 等^[25]的研究结果。此外, 与引进的原种群体(AS)比较 4 个养殖群体(SD, FJ1, FJ6 和 TW)在杂合度方面没有显著变化, 说明了 5 个群体的遗传资源相对丰富。这些结果表明膨腹海马虽然人工繁殖多代但是其遗传多样性相对丰富, 可继续用于人工繁育养殖。遗传距离是衡量群体间遗传分化程度的重要指标, 通过 F_{is} 、AMOV、FCA 和结构分析表明, 膨腹海马的遗传

变异大部分来自种群内,小部分来自于种群间,各个群体都保持着较高水平的遗传距离。本研究中,5个群体的遗传距离为0.0461~0.4529,其中FJ1和FJ6间的遗传距离最小,FJ1和TW间的遗传距离最大,为0.4529,这表明了5个地区的人工选育过程对膨腹海马的遗传结构产生了一定的影响,且从聚类分析和Structure结果推测福建养殖群体和台湾地区养殖群体可能开始出现了遗传分化,这种差异很可能是因为是在养殖过程中,人工选择对于这些养殖群体的影响,后期繁育过程中可以采用两个地区群体进行混合繁育,以提高膨腹海马遗传多样性。

4 结论

本研究共筛选鉴定了6个多态性微卫星位点,6对微卫星引物在144个样本个体中共检测出63个等位基因点。所有6个微卫星的等位基因数范围为8~14之间,平均为10.5。观察到的杂合度和预期杂合度平均值分别为0.4861和0.8194。遗传距离是衡量群体间遗传分化程度的重要指标,5个群体中FJ1和FJ6间的遗传距离最小,为0.0461;FJ1和TW间的遗传距离最大,为0.4529,各个群体都保持着较高水平的遗传距离。这些结果都表明这5个膨腹海马群体遗传多样性总体较丰富,但是群体之间存在差异,这些结果为膨腹海马群体遗传多样性评价及人工繁育种群选择等提供了理论支持。

参考文献:

- [1] Nickel J, Cursons R. Genetic diversity and population structure of the pot-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* in New Zealand[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2012, 46(2): 207-218.
- [2] Kong X Q, Lei C T, Qin S Y. Exploration of factory breeding technology for *Hippocampus abdominalis*[J]. Chinese Fisheries, 2023, 575(10): 58-60. [孔祥青, 类成通, 秦四勇. 膨腹海马工厂化育养技术探究[J]. 中国水产, 2023, 575(10): 58-60.]
- [3] Yan J B, Ma R D, Yu L J. Medicinal values of *Hippocampus*[J]. Chinese Journal of Marine Medicine, 2002, 21(6): 48-52. [严家彬, 马润娣, 于立坚. 海马的药用价值[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(6): 48-52.]
- [4] Ning Y, Si X D, Pan X, et al. A study on grading assessment of cultured seahorse, *Hippocampus kuda* by medicinal quality[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(4): 39-47. [宁燕, 司夏丹, 潘霞, 等. 人工养殖大海马药用品质的分级评定研究[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(4): 39-47.]
- [5] Chen X Z, Zeng Y Y. Analysis of species and identification techniques of seahorses[J]. China Port Science and Technology, 2020(12): 48-54. [陈信忠, 曾韵颖. 海马种类及其鉴定技术分析[J]. 中国口岸科学技术, 2020(12): 48-54.]
- [6] He L B, Qi J F, Lin J B, et al. Artificial propagation and seedling technique of *Hippocampus abdominalis*[J]. Journal of Applied Oceanography, 2022, 41(4): 701-707. [何丽斌, 祁剑飞, 林金波, 等. 膨腹海马人工繁殖与育苗关键技术[J]. 应用海洋学学报, 2022, 41(4): 701-707.]
- [7] Wang Q, Wang X, Xie Z Z, et al. Microsatellite analysis of the genetic relationships between wild and cultivated giant grouper in the South China Sea[J]. Journal of Genetics, 2016, 95(2): 369-376.
- [8] Guo Y S, Wang Z D, Xie Z Q, et al. Isolation and genetic diversity analysis of microsatellite DNA in *Lutjanus erythropterus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2011, 31(4): 13-17. [郭昱嵩, 王中锋, 谢子强, 等. 红鳍笛鲷微卫星 DNA 标记的开发与遗传多样性分析[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(4): 13-17.]
- [9] Duan B H, Liu W B, Li S Q, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity in wild and cultivated *Portunus trituberculatus* in Bohai Bay[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(4): 2543-2551.
- [10] Wang J J, Wang Q, Qin Z, et al. Development of SSR markers from genomic data for *Litopenaeus vannamei* and analysis of genetic diversity in different cultured populations[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(6): 64-74. [王佳佳, 王琼, 秦桢, 等. 凡纳滨对虾全基因组 SSR 标记开发及不同养殖群体的遗传多样性[J]. 水产学报, 2023, 47(6): 64-74.]
- [11] Odjakova T, Todorov P, Radoslavov G, et al. Microsatellite genotyping of two Bulgarian sheep breeds[J]. Diversity, 2022, 14(3): Article No.210.
- [12] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [13] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis[J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981.
- [14] Ruan H T, Xu S N, Li M, et al. Microsatellite primers screening and genetic diversity analysis of five geographical populations of *Pseudolabruca sinensis* in the Pearl River

- Basin[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 501-508. [阮惠婷, 徐姗楠, 李敏, 等. 飘鱼微卫星位点的筛选及珠江流域 5 个地理群体的遗传多样性分析[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 501-508.]
- [15] Sun X W, Zhang X F, Zhao Y Y, et al. Development and application of microsatellite markers in aquatic species[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(4): 689-703. [孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 689-703.]
- [16] Zhuang Z J, Tang M J, Zhang D D, et al. Genetic diversity of three consecutive generations of *Eriocheir sinensis* “Changdang lake 1”[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(9): 1523-1533. [庄振俊, 唐美君, 张冬冬, 等. 中华绒螯蟹“长荡湖 1 号”连续 3 个世代的遗传多样性分析[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(9): 1523-1533.]
- [17] Fu J J, Gong Y T, Zhu W B, et al. Multiplex PCR sets of microsatellites and their application in genetic analyses for three populations of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(9): 1514-1522. [傅建军, 龚雅婷, 朱文彬, 等. 大口黑鲈微卫星多重 PCR 体系及 3 个群体的遗传分析[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(9): 1514-1522.]
- [18] Cheng L. Development of multiplex PCR system of microsatellite markers and genetic structure analysis of populations and families in *Carassius auratus*[D]. Haikou: Hainan University, 2017. [程利. 建立鲫鱼(*Carassius auratus*)微卫星标记 Multiplex PCR 系统分析群体与家系的遗传结构[D]. 海口: 海南大学, 2017.]
- [19] Wen L L, Li J D, Wan D G, et al. Market survey and identification of hippocampus (Haima)[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(7): 969-972. [温琬莲, 李军德, 万德光, 等. 海马市场调查与基原动物鉴定研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(7): 969-972.]
- [20] Peng X J, Fu X J, Qu L Q, et al. Current situation and suggestion of Haima (hippocampus) Industry in Shandong Province[J]. *Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 48(1): 1-9. [彭晓娟, 付先军, 渠立群, 等. 山东省海马产业现状及问题建议[J]. *山东中医药大学学报*, 2024, 48(1): 1-9.]
- [21] Tang G P, Zeng C F, Qi Z X, et al. Biological characteristics and aquaculture prospects of the Fushou tilapia[J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(6): 70-71, 81. [唐国盘, 曾春芳, 齐子鑫, 等. 福寿鱼的生物学特性及养殖前景[J]. *水利渔业*, 2006, 26(6): 70-71, 81.]
- [22] Liu L, Liu C W. Genetic diversity and molecular markers of 5 species of snappers[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(3): 349-355. [刘丽, 刘楚吾. 5 种笛鲷属鱼类的遗传多样性及分子标记[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(3): 349-355.]
- [23] Su S Y, Zhang L B, Li H Y, et al. Genetic diversity and structure analyses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) original and cultured populations based on microsatellite markers[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2020, 46(6): 687-698. [苏胜彦, 张林兵, 李海洋, 等. 基于微卫星标记的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)原种和养殖群体遗传多样性和结构分析[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2020, 46(6): 687-698.]
- [24] Xu H Y, Yang X Y, Ni W, et al. Genetic diversity and genetic structure of selected generations of Chinese pond turtle (*Mauremys reevesii*) based on microsatellite DNA[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2023, 38(5): 812-818. [徐昊旻, 杨雪莹, 倪未, 等. 乌龟选育世代遗传多样性及遗传结构的微卫星分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2023, 38(5): 812-818.]
- [25] DeWoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals[J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56(3): 461-473.

Genetic diversity analysis of cultured *Hippocampus abdominalis* population

ZHENG Leyun², WEI Liyun¹, YAN Xu¹, LU Keyu¹, ZHANG Minlin¹, LIANG Jiantao¹, LIANG Kaishan¹, HE Libin³, GAN Songyong⁴, WU Jinhui⁴, WANG Qing¹

1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361102, China;

3. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China;

4. Marine Fisheries Experimental Center of Guangdong, Huizhou 529699, China

Abstract: *Hippocampus abdominalis* are an economically important aquatic species in China. To understand the genetic structure of five populations of the main farmed distended seahorses in China [the third cultured stock in Shangdong province (SD), the first cultured stock in Fujian province (FJ1), the sixth cultured stock in Fujian province (FJ6), the 12th cultured stock in Tai Wan (TW), and breeding offspring of one Australian wild species (AS)], We developed six polymorphic microsatellite markers of the *H. abdominalis*, and used these 6 microsatellite markers for genetic analysis of five populations of *H. abdominalis*. The results showed that 63 alleles were detected by 6 pairs of primers in 144 samples. The number of alleles ranged from 8 to 14, with an average of 10.5 and $PIC > 0.25$, indicating that all 6 microsatellite loci had high polymorphism. In addition, the observed heterozygosity and expected heterozygosity of the five populations were 0.6603 and 0.8104, respectively, indicating that the genetic diversity of the five populations was relatively rich. Further, the molecular variance analysis and genetic analysis was found that the genetic variation of the five populations mainly came from within the population, and a relatively high level of genetic distance was maintained among the 5 populations, among which the genetic distance between Taiwan (TW) and Fujian (FJ1) populations was the largest at 0.4529. In summary, there were genetic differences among the five *H. abdominalis* populations, and the genetic diversity of the populations was relatively rich and there was no decline in genetic diversity, indicating the 5 *H. abdominalis* populations could continue to be used for subsequent breeding.

Key words: *Hippocampus abdominalis*; microsatellite loci; genetic analysis; expected heterozygosity; genetic structure

Corresponding author: WANG Qing. E-mail: wangqing@scau.edu.cn