

青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析

刘丽, 刘楚吾, 郭昱嵩, 董秋芬, 徐田军

(广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 以中国南海海域青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 为材料, 构建青石斑鱼小片段部分基因组 DNA 文库。以 M_{13} 通用引物和设计合成的微卫星核心序列引物 (CA)₁₅, 用 PCR 法对文库进行筛选, 共获得 96 个微卫星序列, 分别分布于 28 个阳性重组克隆中, 其中 perfect (完美型) 共 39 个 (占 40.6%), imperfect (非完美型) 30 个 (占 31.3%), compound perfect (混合完美型) 7 个 (占 7.3%), compound imperfect (混合非完美型) 20 个 (占 20.8%)。同时发现 (CA/GT)_n 序列在青石斑鱼的基因组 DNA 中含量非常丰富。根据微卫星侧翼序列设计 28 对引物扩增青石斑鱼基因组 DNA, 有 26 对引物能扩增出目的片段, 选用其中 13 对多态性稳定的引物对 19 尾青石斑鱼进行遗传多样性分析。结果显示, 13 个位点共检测到 48 个等位基因, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.598 2, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.508 0, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.472 2, 平均 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D) 为 0.150 3。实验初步表明中国南海海域青石斑鱼的遗传多样性较为丰富, 但在某种程度上受到了人为的干扰。[中国水产科学, 2008, 15 (1): 22-29]

关键词: 青石斑鱼; 基因组文库; PCR 法; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0022-08

微卫星 DNA, 又称短串联重复序列 (STR) 或简单序列重复 (SSR), 是广泛存在真核生物基因组中的简单重复 DNA 片段, 一般每个重复单位仅 1~6 个碱基, 重复数为 10~20 次, 其中动物体中以双核苷酸 (CA/GT)_n 最为常见^[1]。根据微卫星 DNA 核心序列两端的保守序列设计引物, 对基因组 DNA 进行扩增便可以找到相应的微卫星 DNA 标记。微卫星 DNA 标记具有突变率高、共显性好、多态信息容量高、特异性的 PCR 扩增、引物通用性好、技术难度低等特点^[2], 被广泛应用于人类和一些动植物的遗传育种、遗传图谱绘制、数量性状位点定位、标记辅助选择、遗传多样性评估、遗传监测等方面^[3]。

青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 属鲈形目, 鲈总科, 鲈科, 石斑鱼属, 主要分布于北太平洋西部、中国南海及东海南部。青石斑鱼营养价值高, 市场需求量大, 是重要的经济鱼类, 但目前养殖和常规捕捞量有限。青石斑鱼的栖息分散性、性别比不平衡性、世代间隔性和产卵集会性等特点^[4]使青石斑鱼易受到过度捕捞的威胁。同时海区污染、生态条件恶化和海水水质变差, 造成有些地区出现石斑鱼种

质退化、数量减少的现象。在《2005 年世界自然保护联盟受威胁种群红色目录》中青石斑鱼被列为研究数据缺乏的物种, 如果在对青石斑鱼展开全面的研究与调查后数据仍然不全面, 那么青石斑鱼则将被归类为受到威胁的物种^[5]。目前除了养殖技术、病害免疫和繁殖培育等方面^[6]外, 也有对青石斑鱼的分子水平上的研究报道, 项方等^[7]和庄轩等^[8]分别研究了青石斑鱼的 *Cytb* 基因并与其他鱼类进行了系统进化关系上的分析与比较。Satyendra 等^[4]从东大西洋石斑鱼 (*E. marginatus*)^[9]及石斑鱼近缘属的小鳞鲷 (*Mycteroperca microlepis*)^[10]和博氏鲷 (*M. bonaci*)^[11]的 23 对微卫星引物中筛选出 8 对引物分析了青石斑鱼和台湾九棘鱼 (*Cephalopholis formosa*) 的遗传多样性, 但由于实验样品数量与微卫星位点数量有限, 未对青石斑鱼进行全面的群体特征、遗传多样性、亲缘关系及系统发育分析, 因此青石斑鱼的微卫星和遗传多样性还具有很大的研究潜力。本研究通过构建青石斑鱼部分基因组 DNA 文库, 筛选青石斑鱼的微卫星序列, 旨在为青石斑鱼的遗传多样性分析找到更多的分子

收稿日期: 2007-03-19; 修订日期: 2007-07-30.

基金项目: 广东省重大科技兴海项目 (A200099A01); 湛江市 988 科技攻关项目 (2000-121-17).

作者简介: 刘丽 (1981-), 男, 硕士研究生, 从事水产经济动物繁殖生物学研究. Tel: 0759-2362275; E-mail: sbdnw@163.com

通讯作者: 刘楚吾. Tel: 0759-2382044; E-mail: swyjs@gdou.edu.cn

标记,以及在探讨中国南海海域的青石斑鱼群体遗传背景和现状的同时,为青石斑鱼群体遗传结构的分析、遗传资源的保护利用、连锁图谱的构建和分子标记辅助育种等打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

青石斑鱼样品采自中国南海湛江海域,根据文献 [12] 鉴定后从尾静脉取血液于 ACD 抗凝剂 (81.7 mmol/L 右旋葡萄糖, 22.8 mmol/L 柠檬酸, 44.9 mmol/L 柠檬酸钠) 中抗凝, -70℃ 保存。实验所用的限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hae* III、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、PCR Marker、*PBR322/Msp* I DNA Markers 购自北京华美生物工程公司。pUCm-T 载体 PCR 产物克隆试剂盒、引物 (CA)₁₅ 重复序列和 M₁₃ 通用引物购自上海生工生物工程技术有限公司。大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存的菌种。实验所用的其他试剂均为分析纯。

1.2 青石斑鱼部分基因组文库的构建

按《分子克隆实验指南》的方法 [13] 从血液样品中提取基因组 DNA。经限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hae* III 双酶切后,通过 PCR 反应在酶切产物末端加上 A 碱基,将反应产物抽提纯化后在 16℃ 下与 T-载体连接 4 h,连接后转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于已添加 X-gal 的氨苄青霉素 LB 平板上,37℃ 培养过夜。用无菌的牙签挑取白色单菌落,接入 1.5 mL 的离心管,以 220 r/min 37℃ 于恒温振荡器中振荡培养过夜后, -70℃ 超低温保藏备用。

1.3 PCR 法快速筛选含微卫星序列的阳性克隆

以菌液为模板,用 M₁₃ 通用引物和微卫星核心序列双核苷酸引物 (CA)₁₅ 进行 PCR 扩增,PCR 反应体积为 15 μL,其中含 10 × Buffer 1.5 μL, dNTPs (2 mmol/L) 1.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.2 μL, 30 μmol/L 的 5' 和 3' 端引物各 1.0 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, 模板菌液 1.0 μL, 无菌水 7.6 μL。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 3 min 后, 94℃ 变性 42 s, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min [14]。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用 Tanon GIS-2008 型凝胶成像系统拍照,保存待分析。

1.4 阳性克隆的序列测定及结果分析

挑取 PCR 结果为阳性的克隆菌液委托上海生工生物工程技术有限公司测序,然后用 SSR-

Hunter1.3 软件寻找测序结果中所含的微卫星 DNA 核心序列和两端的保守序列,分析微卫星特征并将微卫星序列提交至 GenBank。

1.5 微卫星引物的设计

根据微卫星序列两端足够长的侧翼序列用 Primer5.0 软件设计引物,引物长度为 20 bp 左右, (G+C)% 为 40%~60%, *T_m* 值为 55~60℃,产物长度 50~400 bp,委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.6 微卫星位点的多态性扩增

利用合成的引物对青石斑鱼基因组 DNA 进行 PCR 扩增分析,PCR 反应体积为 15 μL,其中含 10 × Buffer 1.5 μL, dNTPs (2 mmol/L) 1 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 0.9 μL, 30 μmol/L 的 5' 和 3' 端引物各 1.5 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, 模板 DNA 0.8 μL, 无菌水 7.6 μL。反应程序为 94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 42 s, 45~60℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,硝酸银染色,拍照保存。

1.7 数据统计指标

根据每个个体产生的条带的位置确定基因型,利用 GENPOP Version 3.4 处理数据,计算等位基因数、观测杂合度 (*H_o*) 和期望杂合度 (*H_e*),按照 Botstein 等 [15] 的分类方法计算位点多态性信息含量 (PIC),并进行群体平均杂合度 (*H_e*) 和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (*D*) 的计算 [16-17]。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m p_i^2 p_j^2;$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2;$$

$$D = (H_o - H_e) / H_e$$

P_i 和 *P_j* 分别为第 *i* 和第 *j* 个等位基因在群体中的频率, *m* 为等位基因数

2 结果与分析

2.1 PCR 法筛选含微卫星的阳性克隆

本实验共得到了 900 个重组阳性克隆,以 M₁₃ 通用引物和微卫星核心序列引物 (CA)₁₅ 对其进行 2 次 PCR 扩增,共得到 33 个可能含有微卫星核心序列的 PCR 阳性克隆。图 1 为第一次 PCR 筛选电泳图,由图可知泳道 B₁、B₂ 和 B₃ 均出现了 1 条小

于泳道 A 的条带,说明 1、2 和 3 号克隆可能含有微卫星位点。

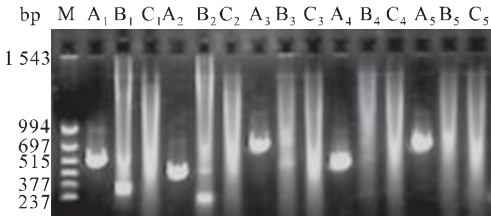


图 1 PCR 法筛选青石斑鱼微卫星序列的电泳图
M 为 PCR Markers, A: 引物 M₁₃⁺/M13⁻ 扩增结果, B: M₁₃⁺/(CA)₁₅ 扩增结果, C: (CA)₁₅/M₁₃⁻ 扩增结果。

Fig.1 PCR screening clones containing microsatellites in *E. awoara*

M: molecular size marker (DL1543); Lane A: The products of clones by M₁₃⁺/M₁₃⁻; Lane B: The products of clones by M₁₃⁺/(CA)₁₅; Lane C: The products of clones by (CA)₁₅/M₁₃⁻.

2.2 阳性克隆的序列测定及结果

进行测序的 33 个 PCR 阳性克隆中,除 5 个克隆信号较弱外,剩余的 28 个克隆共含有 96 个微卫星核心序列。其中 (CA/GT)_n 55 个,占 57.2%, (AG)_n 12 个,占 12.5%, (AT)_n 8 个,占 8.3%, (CG)_n、(GTC)_n、(GACA)_n、(TTTTTTTAA)_n 等其他重复序列各自所占的比例都很小。在这些微卫星核心序列中,重复次数大多集中在 8~25 次,占 60%。而按照 Weber^[18] 提出微卫星的评价标准,本实验获得的青石斑鱼微卫星序列中 perfect(完美型)40 个,占 41.7%; imperfect(非完美型)29 个,占 30.2%; compound perfect(混合完美型)7 个,占 7.3%; compound imperfect(混合非完美型)20 个,占 20.8%。将序列提交至 GenBank,审核后获得本研究中青石斑鱼微卫星序列的登陆号 (DQ914892-DQ914916)。表 1 列举了部分微卫星核心序列、类别和 GenBank 的登录号。图 2 为青石斑鱼基因组中微卫星的特征序列图。

表 1 部分青石斑鱼微卫星核心序列及其引物
Tab.1 Partial microsatellites repeat motifs and relevant primers of *E. awoara*

克隆编号 Clone No.	核心序列 Core repeat sequence	类别 Repeat type	登录号 Accession no.	上游引物序列 Forward primer sequences	下游引物序列 Reverse primer sequences	退火 温度/℃ <i>T_m</i>
D161	(CA) ₄ T(CA) ₁₅	Imperfect	DQ914895	TAGTTCCAGAAAGCAA	CCAGGGGATAATGTCA	51
D255	(GACA) ₆ (CA) ₂₀	Compound Perfect	DQ914896	ATTGTGAGCGGATA	TTTTGCATAAGTGC	50
D260	(CA) ₁₄ (CG) ₅	Compound Perfect	DQ914897	TCACCTCGTCTACTGTCTT	GTTTCATCGTCCAGTTAGG	49
D316	(CA) ₈	Perfect	DQ914898	GAGCCTAAAGACCCAAAT	ATCGAAAACCATCAAACA	52
D463-1	(CA) ₃ AA(AC) ₂ AT(AC)	Compound Imperfect	DQ914902	GAGCCACGACGACTGTTT	GTCTGCACTTACTCTTTCTGTT	53
D469	(AC) ₂₇	Perfect	DQ914904	ACCGAGATTAACCACAAA	TTTCGACGAACCGACATA	49
D496	(CT) ₃ (CA) ₂₄ CC(TG) ₃	Compound Imperfect	DQ914905	TTACTGGCAGCAATGGAC	GATGTATGACTACGAATGG	50
D504	(CA) ₁₇	Perfect	DQ914907	TGAGACCAAACCAACCTT	TCTTCGGAACGGACATAC	55
D545	(CA) ₂₀	Perfect	DQ914909	TGCTGGCTCACTGTTACTC	CGTCTGCCTCCCATCTAA	55
D548-1	(TG) ₂ AG(TG) ₅	Imperfect	DQ914910	ACCAGATAACAAGATGCC	GTAAAATGAAATACAGCTCA	53
D568-2	(CA) ₅	Perfect	DQ914911	ACGGGTACGTTTATGTGA	ACGGGTACGTTTATGTGA	55
D629	(AC) ₁₀	Perfect	DQ914912	CACGATGCGATTTAGTCA	GTGAAACAGGCGTAATA	45
D762	(CA) ₇ C(CA) ₉	Imperfect	DQ914915	CGGGCATGTTGAAATT	CAGAACGGCGAGGAAA	55

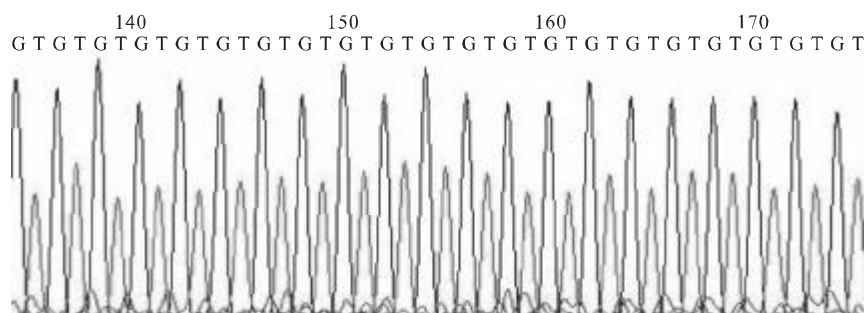


图 2 青石斑鱼基因组中微卫星特征的 (GT)_n 重复序列

Fig.2 Typical (GT)_n repeat sequence in *E. awoara* genomic microsatellite

2.3 微卫星引物的设计

根据微卫星序列的侧翼序列设计了 28 对引物, 引物的命名与克隆编号相对应。用于本实验分析的 13 对引物序列和退火温度见表 1。

2.4 微卫星位点的多态性分析

经过优化 PCR 反应条件,在 28 对微卫星引物中有 26 对能扩增出稳定的产物,但只有 13 对引物的扩增片段有较稳定的多态性(图 3),其余的都是单态。

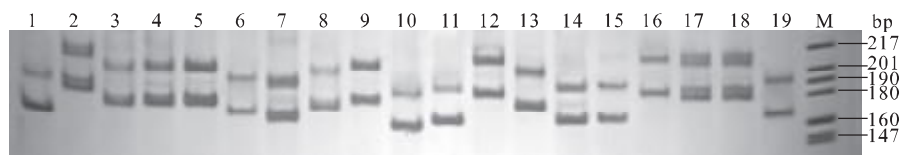


图3 青石斑鱼微卫星 D496 在 19 个青石斑鱼个体中的扩增图谱

M: PBR322/Msp I DNA Markers; 1~19: 青石斑鱼个体编号.

Fig. 3 Amplified alleles of microsatellite D496 in 19 individuals of *E. awoara*.

M: PBR322/Msp I DNA Markers; 1–19: individual numbers.

根据引物的扩增结果,选择其中多态性较好的 13 对引物的扩增数据进行观测杂合度 (H_o) 等的统计分析 (表 2)。在 13 个微卫星位点上共获得了 48 个等位基因,大部分为 2~3 个,大小在 65~369 bp 之间,表现出高度多态性。根据基因型计算所得的观测杂合度 (H_o) 的范围在 0.111 1~1.000 0 之间,在位点 D496 和 D504 中 H_o 达到了 1。期望杂合度 (H_e) 的范围较小,从 0.149 1 到 0.891 8,其中位点 D504、D548-1 和 D629 的观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 有较大的差异,但整个群体的平均观测杂合度 (H_o) 和平均期望杂合度 (H_e) (群体平均杂合度) 相近,分别为 0.598 2 和 0.507 8。13 个位点的平均多态信息含量 (PIC) 为 0.472 2,其中位点 D469 最低为 0.140 1,位点 D496 最高为 0.864 4。位点 D161、D463-1、D496、D504、D548-1、D568-2 和 D762 属于高度多态性位点,位点 D255、D260、D545 和 D629 属中度多态性,位点 D316 和 D469

则属低度多态位点。Hardy-Weinberg 平衡指数 (D) 的变化范围较大,从 $-0.618\ 1$ 到 $0.732\ 5$,由此平均值变得很小,为 $0.150\ 3$ 。位点 D161、D255、D316、D496、D504、D545、D548-1 和 D629 都出现了杂合过剩现象,特别是位点 D504,其 Hardy-Weinberg 平衡指数已达 $0.732\ 5$ 。而位点 D260 和 D762 则出现了缺失,前者缺失较严重。

3 讨论

3.1 青石斑鱼微卫星DNA特征

PCR 法筛选微卫星序列操作简便快捷,可直接用菌液为模板而省去了提取质粒的操作,同时避免了同位素污染环境、危害人体等缺点^[13],但 PCR 法过于灵敏,经常会出现非特异性条带,要减少非特异带的产生可通过改善 PCR 条件或通过设立阴性克隆的对照来筛选,本实验还利用 2 次 PCR 法进行筛选从而提高了筛选精确度。

表2 青石斑鱼 13 个微卫星座位的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量、Hardy-Weinberg 平衡指数以及群体平均杂合度

Tab.2 Number of alleles, allele size range, observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphism information content (PIC), Hardy-Weinberg departure value (D) and heterozygosity at the 13 microsatellites loci assessed in *E. awoara*

微卫星标记 Microsatellite marker	等位基因数 No. of alleles	等位基因大小 /bp Allele size range	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	平均偏离指数 D
D161	3	118–160	0.894 7	0.630 1	0.580 2	0.419 9
D255	2	215–230	0.333 3	0.284 3	0.258 5	0.172 4
D260	2	212–240	0.111 1	0.290 9	0.258 5	-0.618 1
D316	2	215–241	0.263 2	0.233 9	0.215 5	0.125 3
D463-1	5	95–124	0.588 2	0.562 5	0.531 9	0.045 7
D469	2	200–218	0.157 9	0.149 1	0.140 1	0.059 0
D496	11	159–215	1.000 0	0.891 8	0.864 4	0.121 3
D504	3	237–283	1.000 0	0.577 2	0.527 0	0.732 5
D545	2	338–369	0.421 1	0.339 2	0.304 8	0.241 5
D548-1	7	65–86	0.944 4	0.799 0	0.765 7	0.182 0
D568-2	4	249–271	0.764 7	0.720 6	0.676 7	0.061 2
D629	2	207–229	0.631 6	0.438 6	0.385 4	0.440 0
D762	3	119–139	0.666 7	0.686 3	0.629 6	-0.028 6
平均值 Mean	3.69		0.598 2	0.507 8	0.472 2	0.150 3

许多研究表明鱼类微卫星中以 (CA/GT)_n 的数量居多^[1, 19], 因此本研究首先利用 (CA)₁₅ 引物通过 PCR 法从 900 个克隆筛选出了含有 (CA/GT)_n 和其他类型的重复序列的 28 个阳性克隆, 即每检测大约 30 个克隆就有 1 个阳性克隆。由于每个克隆中插入片段的平均大小为 800 bp, 由此可计算出在基因组中大概每 2.5 kb 就有 1 个微卫星。在所得的 96 个微卫星序列中, (CA/GT)_n 共有 55 个, 占 57.2%, 这表明了 (CA/GT)_n 在青石斑鱼基因组中含量丰富且分布广泛。本研究所得完美型 (perfect) 的微卫星占大多数 (为 41.7%), 与剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*)^[19]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[20] 等鱼类的微卫星情况大体相符。本研究还表明, 在青石斑鱼中除了有大量的双碱基重复序列外, 还有其他三碱基、四碱基和四碱基以上的微卫星序列。序列重复次数有 60% 在 8~25 次之间, 这点与 El-legren^[21] 分析微卫星的结论相似, 他认为真核生物中长度大多在 30 次重复以下。

3.2 青石斑鱼群体遗传多样性分析

有很多学者^[22-25] 已利用微卫星标记研究过一些石斑鱼及石斑鱼近缘属种内和种间的遗传多样性。但除了 Satyendra 等引用近缘物种微卫星引物筛选出青石斑鱼的 8 个微卫星标记外, 还未见有关

分离青石斑鱼微卫星的报道。本实验获得了青石斑鱼 96 个微卫星序列和 13 个具有多态性的微卫星标记, 比已报道的其他石斑鱼的微卫星序列数量和微卫星标记数量都要多。根据对所得数据的分析, 本研究的 13 个微卫星标记的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度的范围比 Satyendra 等所得的范围广 (分别是 3~6、0.291~0.958 和 0.348~0.716), 这与微卫星标记的数目有直接的关系。

本研究出现了影子带 (stutter bands) 现象, 如图 1 中的 2、17、18 号个体出现 4 条带, 这与微卫星呈共显性遗传的原理不相符。关于“影子带”的产生机理的报道不多, Murra 等^[26] 认为影子带的产生机理可能是扩增中 DNA 链在复制时滑动误配所致, 王吉振等^[27] 发现影子带是由特异性扩增带和非特异扩增带不完全配对形成的异质链, 结构上形成不配对的、突出的环。正是这一突出的环状结构减慢了影子带的泳动速度。本实验通过严格的 PCR 反应条件、控制银染、显色时间和洗胶时间, 最大程度减少了影子带的出现。影子带泳动的速度一般比“主带”慢, 且染色较浅, 特异带是最强带, 并且在同一对引物中的出现有规律可循, 因此并不影响等位基因的判读。

群体杂合度的高低反映了群体在多个基因上

的遗传变异及群体遗传多样性丰富度。群体杂合度越高,表明该群体的遗传变异越多,群体遗传多样性越高。本研究中青石斑鱼群体平均杂合度即平均期望杂合度 (H_e) 为 0.508 0,平均观测杂合度 (H_o) 为 0.598 2,说明青石斑鱼遗传多样性较高。位点 D504、D548-1 和 D629 的 H_o 和 H_e 存在较大的差异,这可能是由这 3 个位点上的无效基因 (null allele)^[28]所引起的,在 PCR 扩增过程中,当无效等位基因不被识别出来的时候就会导致群体中纯合子过剩或杂合子缺失,从而导致 H_o 和 H_e 出现偏离。

多态信息含量 (PIC) 也是一个评价基因座位在群体中的多样性程度的标准。本实验中所用的 26 个微卫星位点中有 13 个具有多态性,多态信息含量在 0.140 1~0.844 2 之间,多态性位点占总位点数的 50%,其中高度多态位点有 7 个 (D161、D463-1、D496、D504、D548-1、D568-2、D762),中度多态位点有 4 个 (D255、D260、D545、D629),剩余 2 个位点 (D316、D469) 则属低度多态位点。

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (D) 反映了 H_o 和 H_e 两者之间的平衡关系, D 值越接近 0,基因型的分布越接近于平衡状态, D 值为正时反映杂合子过剩, D 值为负时则处于杂合子缺失状态^[29]。本研究中的 D 变化范围较大,从 -0.618 1 到 0.732 5,同时出现了杂合子过剩 (8 个位点) 与缺失 (2 个位点) 现象,位点 D161、D260、D540 和 D629 的基因型分布偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。杂合子过剩现象一般出现在研究对象为相对小的群体或者封闭群体,如一个养殖群体里面的子代群体是由有限的亲本所产生,创造者效应 (Founder effect) 和瓶颈效应 (Bottleneck effect) 会导致连锁不平衡现象^[16],从而导致杂合子过剩。而杂合子缺失除了与无效基因和研究样本范围大小有关外,还可能由种群退化、性别比例不均衡、亲缘近交和人为干扰程度大等导致稀有碱基的丢失所致^[25]。本研究所用的青石斑鱼样品采自湛江海域的 3 个不同地点,且实验样本数达到了 19 尾,只有在利用引物 D255、D260、D545 和 D629 进行 PCR 多态性扩增时少数几个个体没有扩增产物外,其他 9 对引物的扩增产物都较清晰稳定。由此本实验的杂合子过剩和缺失与种群本身的结构有密切的关系,可能是由于过度捕捞等人干扰使其种群结构和性别比例受到影响。

以上遗传参数表明中国南海海域的青石斑鱼群体多态性水平较高,遗传多样性丰富,但是种群

结构和种质资源受到了人类活动的一定影响。务必要加强对青石斑鱼遗传多样性的保护,并保护海洋生态环境和控制捕捞量,使青石斑的遗传多样性处于一个相对稳定的丰富程度。还要加紧对青石斑鱼遗传育种等方面的研究,提高青石斑养殖产量以满足市场需求,从而减少对青石斑鱼自然种群的压力。

微卫星的一个潜在价值是一个物种所产生的微卫星引物能应用于相关的物种^[30],学者们对石斑鱼微卫星的研究也表明一种石斑鱼的微卫星引物对其他石斑鱼有一定的适用性,因此本研究所得的 26 个微卫星引物 (相关信息可在 GenBank 搜索到) 都可尝试性地被用于其他石斑鱼微卫星多态性、遗传多样性和种群进化等研究,为种质资源保护提供理论依据,从而为石斑鱼属鱼类的可持续开发利用提供科学指导。

参考文献:

- [1] Maguire T L, Edwards K J, Saenger P, et al. Characterization and analysis of microsatellite loci in mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 279-285.
- [2] 胡则辉,周志刚. 微卫星 DNA 标记技术及其在海洋生物遗传学中的应用 [J]. 海洋湖沼通报, 2006, 1(4): 37-45.
- [3] 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.
- [4] Satyendra K U, Su Y Q, Wang J, et al. Identification and characterization of microsatellite markers for yellow grouper *Epinephelus awoara* and bluespotted hind *Cephalopholis Formosa* [J]. High Technol Letters, 2005, 11(3): 329-322.
- [5] Shuk M C, Ng W C. *Epinephelus awoara* [EB]. IUCN Red List of Threatened Species, 2005 [2006-09-10]. <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/61336/all>.
- [6] 尹绍武,黄海,张本,等. 石斑鱼遗传多样性的研究进展 [J]. 水产科学, 2005, 24(8): 46-49.
- [7] 项方,邹记兴,邓凤娇,等. 用细胞色素 *b* 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育 [J]. 动物学杂志, 2004, 39(51): 13-18.
- [8] 庄轩,丁少雄,郭丰,等. 基于细胞色素 *b* 基因片段序列研究中国近海石斑鱼类系统进化关系 [J]. 中国科学 (C 辑), 生命科学, 2006, 36(1): 27-34.
- [9] Innocentiis S De, Sola L, Cataudella S, et al. Allozyme and

- microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 2 163 2 175.
- [10] Robert W C, George R S, Christopher C K, et al. Stock identification of gag, *Mycteroperca microlepis*, along the Southeast Coast of the United States [J]. *Mar Biotech*, 1999, 1: 137-146.
- [11] Zlatoff M S, Ball A O, Chapman R W. Characterization of polymorphic microsatellite loci from black grouper, *Mycteroperca bonaci* (Teleostei: Serranidae) [J]. *Mol Ecology Notes*, 2002, 2: 217-219.
- [12] 成庆泰,郑葆珊. 中国鱼类系统检索 [M]. 北京: 科学出版社, 1987, 287-291.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南: 第 3 版 [M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 30 35.
- [14] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆 [J]. *水产学报*, 2001, 25 (2): 127 130.
- [15] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314-331.
- [16] 刘云国, 陈松林, 李八方. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究 [J]. *海洋水产研究*, 2005, 26 (5): 28-32.
- [17] 耿波, 孙效文, 梁利群. 利用 17 个微卫星标记分析鳙鱼的遗传多样性 [J]. *遗传*, 2006, 28 (6): 683-688.
- [18] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n、(dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7: 524-530.
- [19] 李霞, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11 (3): 197-201.
- [20] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. *动物学研究*, 2001, 22 (3): 238 241.
- [21] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. *Trends Genet*, 2002, 18: 70.
- [22] Nugroho E, Takagi M, Sugama K, et al. Detection of GT microsatellite loci and their polymorphism for grouper of the genus *Epinephelus* [J]. *Fish Sci*, 1998, 64: 836-837.
- [23] Malia A J R, Glenn C G, George K R. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian grouper *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses [J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5: 126-129.
- [24] Rhoads K L, Lewis R L, Chapman R W, et al. Genetic structure camouflage grouper, *Epinephelus plioptekad- ion* (Pisces: Serranidae), in the western central Pacific [J]. *Mar Biol*, 2003, 142: 771-776.
- [25] Suci A, Uthairat N N, Worawut K. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. *Mar Biotechnol*, 2005, 0: 1 10.
- [26] Murray V, Chutima M, England P R. The determinations of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR [J]. *Nuc Ac Res*, 21 (10): 2 395 2 398.
- [27] 王吉振. 绵羊高繁殖力基因 *FecB* 和 *FecX1* 的连锁微卫星位点的遗传研究 [D]. 北京: 中国农业大学图书馆, 2000, 45-46.
- [28] 陈微, 张全启, 于海洋, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (6): 682-687.
- [29] 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.
- [30] Schlottterer C, Amos W, Tautz D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in Cetacean species [J]. *Nature*, 1991, 354: 63-65.

Isolation and population genetic diversity analysis of microsatellite DNA markers in yellow grouper (*Epinephelus awoara*)

LIU Li, LIU Chu-wu, GUO Yu-song, DONG Qiu-fen, XU Tianjun

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The microsatellites of *E. awoara* were isolated and the genetic diversity were analysed in this study. Firstly, a library of partial small size fractionated genomic DNA was constructed with the *E. awoara* from South China Sea. 96 microsatellites in 28 recombinant positive clones were obtained through PCR screening the library with M₁₃ universal primers and simple tandem repeats primer (CA)₁₅. Among these microsatellites, there were 39 perfect ones (40.6%), 30 imperfect ones (31.3%), 7 compound perfect ones (7.3%) and 20 compound imperfect ones (20.8%). The results indicated that microsatellite sequences characterized by (CA/GT)_n were abundant in genomic DNA of *E. awoara*. Among the 28 pairs of primers which were designed to analyze genomic DNA of *E. awoara* according to unique microsatellite flanking sequences with the software Primer 5.0, 26 pairs could be amplified as expected bands, and 13 microsatellite markers were assessed genetic diversity for 19 individuals. As a consequence, the data showed that the average observed heterozygosity (H_o) was 0.598 2; average expected heterozygosity (H_e) was 0.508 0; average polymorphism information content (PIC) was 0.472 2 and average Hardy-Weinberg departure value (D) was 0.150 3 respectively. The findings indicated that although the genetic diversity of *E. awoara* in South China Sea was rich, it had been influenced by human behaviors to a certain extent. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 22-29]

Key words: *Epinephelus awoara*; genomic library; PCR; microsatellite; genetic diversity

Corresponding author: DONG Qiu-fen. E-mail: sbdnw@163.com

书 讯

由中国工程院院士、我国著名鱼类生理学家林浩然教授和他的助手刘晓春博士编著的《鱼类 生理学实验技术和方法》一书已于 2006 年 12 月由广东高等教育出版社正式出版发行。

该书以中山大学生命科学学院水生经济动物研究所鱼类生理学研究室教学工作中编写的实验 课教材和科学研究中使用的技术方法为基础,吸收当前国内外鱼类生理学研究的一些新技术 综合整理编写而成。全书包括营养、消化、吸收、血液和血液循环、排泄、渗透压调节、生 殖、内分泌、神经和感觉等鱼类生理学各个主要方面的实验技术与方法共 42 个。除了保留一 些经典性的实验方法外,着重介绍当前国内外鱼类生理学研究中较常用的新技术。书末还有 6 个附录,介绍鱼类生理学实验和研究的常用操作方法和基本技能。

该书可供综合性大学、师范院校、水产院校和农业院校的生物学专业、动物学专业、鱼类学 专业、水产学专业、海洋生物学专业以及其他有关专业的大专、本科学生和研究生作为实验 课教材,也可供从事动物生理学、鱼类生理学、比较生理学、环境生理学、比较内分泌学、生物工程学、水产养殖学、海洋生物学等研究工作的 专业科技人员参考。

目前,该书已开始发行,定价: 38 元。需要购书者可与广东高教出版社联系(地址: 广州市 天河区林和西横路,邮编: 510500)。亦可直接与刘晓春博士联系(广州市新港西路 135 号,中山大学生命科学学院,邮编: 510275, [E-mail:lsslxc@mail.sysu.edu.cn](mailto:lsslxc@mail.sysu.edu.cn))。