

牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析

刘海金^{1,3}, 朱晓琛², 孙效文³, 杨立更², 薛玲玲^{1,3}, 毛连菊⁴

(1. 中国水产科学研究院 北京 100039; 2. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站 河北 秦皇岛 066100; 3. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 4. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 利用 16 对微卫星分子标记对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的 5 个养殖群体进行遗传多样性分析。结果表明, 等位基因数为 2~9 个, 平均等位基因数为 6.062 5; 有效等位基因数 1.259 6~5.516 1, 平均有效等位基因数 3.692; 各位点的杂合度观测值 (H_o) 0.220 0~0.800 0; 杂合度期望值 (H_e) 0.206 1~0.818 7。各群体之间无偏倚杂合度期望值从小到大依次为丹东、北戴河、威海、青岛、荣成。Kruskal-Wallis 检验结果 ($H=0.672$, $df=4$, $P=0.955$) 则说明, 5 个群体遗传多样性差异不显著。群体间基因分化系数 (G_{ST}) 为 0.099 1, 各群体之间存在中度遗传分化。采用 UPGMA 法对 5 个群体进行聚类, 可分 3 类: 丹东和北戴河各为一类, 威海、荣成、青岛为一类, 其中威海与荣成群体的分化最小。结合 Hardy—Weinberg 平衡 χ^2 拟合度检验和遗传偏离指数 (d) 的分析结果表明, 各群体的遗传平衡状况存在很大差别。遗传变异的分析结果说明 5 群体遗传多样性比较丰富。[中国水产科学, 2008, 15(1): 30~37]

关键词: 牙鲆; 养殖群体; 遗传多样性; 微卫星

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0030-08

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是中国主要海产经济鱼类, 主要分布于渤海、黄海以及东海海域。牙鲆个体大, 生长快, 味道鲜美, 是深受欢迎的鱼类。中国 20 世纪 90 年代开始养殖牙鲆时, 各养殖场从海上捕捞野生亲鱼, 经驯化后产卵繁殖。近年牙鲆自然资源量骤减, 即使在繁殖季节, 数量也很少, 从海中采捕野生亲鱼十分困难。因此, 多数育苗场从自养群中挑选性状好的个体留作亲鱼, 繁衍后代。中国牙鲆养殖用卵主要来自几个大型育苗场。养殖品种的遗传资源是养殖业生产和可持续发展的基础, 也是满足未来不可预见需求的重要基因库。重要育苗场繁殖群体的遗传多样性及遗传变异情况对养殖群体遗传性状影响甚大, 因此, 从 DNA 水平对其进行研究具有十分重要的意义。

日本学者 Sekino^[1] 采用微卫星和 mtDNA 这 2 种 DNA 分子标记对日本的牙鲆野生群体和养殖群体进行了系统的研究。国内学者对牙鲆的群体遗传学研究主要采用同工酶、RAPD、微卫星等技术手段, 集中于野生群体和养殖群体的比较^[2-4], 针对养殖群体的研究仅见同工酶方面的研究^[5]。关于中国主要牙鲆养殖群体遗传差异的研究尚未见报道。

本研究选择北方沿海 5 个重要养殖场作为研

究对象, 采用微卫星分子标记技术分析其养殖群体的遗传结构和遗传多样性, 以期对牙鲆养殖群体遗传改良及良种选育等提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 DNA 提取

选择养殖历史较久、依靠自产苗种的 5 个北方养殖场作为本研究的取样地点 (表 1)。样品均为各养殖场的 1 龄鱼, 样本全长 9.6~39 cm, 体质量 6.37~610 g, 每组样本数量 30 尾。剪取尾鳍鳍条分装于液氮中, 到达实验室后置于 -80℃ 中保存。DNA 提取参照邹曙明等^[6] 的方法。

表 1 牙鲆样本来源

Tab.1 Sources of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* sampled in this study

群体 Stock	来源 Source
北戴河 Beidaihe	中国水产科学研究院北戴河中心实验站
丹东 Dandong	辽宁丹东东港华正水产有限公司
威海 Weihai	山东威海华新海海洋生物股份有限公司
荣成 Rongcheng	山东荣成好当家集团有限公司
青岛 Qingdao	中国水产科学院黄海水产研究所小麦岛试验基地

收稿日期: 2007-05-10; 修订日期: 2007-08-06.

基金项目: 国家科技攻关项目 (96-920-44-01); 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1207); 农业科技跨越计划 (2006 跨 18).

作者简介: 刘海金 (1951-), 博士, 研究员, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: liuhaijin@hotmail.com

1.2 PCR反应及电泳结果分析

本研究所利用的 8 对微卫星引物来自 Coimbra 开发的牙鲆微卫星引物^[7]，均为 CA 重复。为了更好的反映样本的遗传结构，根据牙鲆的遗传连锁

图谱^[8]选取了另外 2 个连锁群的微卫星引物，从 GenBank 获得引物序列。各位点引物序列，连锁群及特异退火温度见表 2。

表 2 引物序列，连锁群及特异退火温度
Tab.2 Sequence, linkage group and specific annealing temperature of microsatellite primers

位点 Locus	引物序列 (5' -3') Primer sequence (5' -3')	复性温度 /℃ Annealing temperature	连锁群 Linkage group	GenBank 登录号 GenBank assession no.
<i>Poli6TUF</i>	F: CATGGATACACTCACAGACACA R: CGATCAACGCTGCTGATG	60	1	AB037979
<i>Poli9TUF</i>	F: GATCTGCAGAAACACACACTCA R: GCGAGTTCTTCCTCAAATGC	62	5	AB037980
<i>Poli9-8TUF</i>	F: GAGAGACAGAAGGTCGTCAACGGTA R: ACAAAGACCACGATGCAAAGTGAC	62	15	AB037989
<i>Poli11TUF</i>	F: ATGAAAACCACCAAGAATCCC R: GGCGCATTTGGTAGTTTGGT	60	17	AB037981
<i>Poli13TUF</i>	F: CACCTCCAGGTTCTACAGTCG R: TCCTGCACAGAGGATGAAAA	62	3	AB037982
<i>Poli18TUF</i>	F: CACGCACACACAAGCTCC R: CGTGGGGTGAGGTTATGG	60	3	AB037983
<i>Poli19TUF</i>	F: ATGGCTGTACTGCAGCAGG R: CGCAAAAACAACAGATGTTCA	60	4	AB037984
<i>Poli23TUF</i>	F: CACAGTGTCACAAAGTGGTGG R: GGGTGTTCTGTGTCATGCTG	60	2	AB037985
<i>Poli30TUF</i>	F: GAGACAACCCCCAAGAAAT R: ATCAGGGTATTGTTTTTGCCC	60	2	AB037988
<i>Poli117TUF</i>	F: CAGTGATGAATGCACCCAGTCATAC R: TCTGTACCGAAGAAGTGAGGGTGTC	60	7	AB037992
<i>Poli123TUF</i>	F: TATCTGACCAGAAGTGGAGGGTCTG R: GCGTGTGCATTCGATATACATTTTG	60	20	AB037994
<i>Poli130TUF</i>	F: GCGGTGAGGACTTTATTTCTGGACT R: GTGGTACTGCAGAAAAGCGACTGTT	60	1	AB037996
<i>Poli131TUF*</i>	F: TCTCTCTGCACGACGCTTATCCTAC R: AGTGTGTACCTGTTTGGTCCAAAT	60	12	AB086523
<i>Poli132TUF*</i>	F: CTGAGGCAAAAATGCTTGATACAT R: CGCCACTCTAGTTTCATCTAAAACACG	60	11	AB086525
<i>Poli141TUF*</i>	F: TATGCACAGTTTGAATGGGTGAATG R: TATGACTTCCAGTACGACGTGGTGA	57	14	AB086537
<i>Poli147TUF*</i>	F: TGGAAGTGTGACAAGGAAAGAGAGG R: ATAAAGCGGAGCTTGAACATGTCAC	60	18	AB086549

* 引物序列从 GenBank 获得。
*Primer sequences were got from GenBank.

PCR 反应体系为 25 μL，包括 10×buffer 2.5 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1 μL、dNTPs (2 mmol/L) 各 1 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、模版 1 μL (30~50 ng)、Taq DNA 聚合酶 1 U，加适量 dd H₂O。反应程序为：94 ℃ 预变性 3 min，94 ℃ 30 s，57~62 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，35 个循环，最后 72 ℃

延伸 10 min, PCR 扩增在 PE9700 型 PCR 仪上进行。PCR 产物检测采用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 内含有 1/20 体积的 Goldview, 浓度为 10 mg/L。用 GDS8000 凝胶成像仪照相, 扩增产物片段大小由 Gel-Pro Analyzer 4.5 凝胶分析软件分析。

1.3 数据分析

计算了 5 个养殖群体在 16 个微卫星位点上的平均等位基因数 (A)、平均有效等位基因数 (N_e)、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)、遗传距离 (D)、基因分化系数 (G_{ST}) 和基因流 (N_m)^[9], 以上各参数均由群体遗传学分析软件 Popgene 1.32 处理。用 SPSS 10.0 软件对各位点的杂合度期望值 (H_e) 进行 Kruskal-Wallis 检验。使用 MEGA3.0 软件, 采取 UPGMA 方法根据 5 个群体的遗传距离 (D) 进行聚类。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

本研究所利用的 16 对微卫星引物均能在牙鲆样品中稳定重复的扩增出相应的同源序列 (图 1)。反映各个座位在养殖群体遗传多样性的参数 A 、 N_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 值列于表 3。在所检测的 16 个位点中, *Poli19TUF* 的多态性最低; *Poli117TUF* 多态性较低, 其余 14 个位点在 5 个群体中均呈现较高的多态性。16 个位点的等位基因数为 2~9

个, 平均等位基因数为 6.062 5; 有效等位基因数 1.259 6~5.516 1, 平均有效等位基因数 3.692; 各位点的杂合度观测值 (H_o) 0.220 0~0.800 0; 杂合度期望值 (H_e) 0.206 1~0.818 7; PIC 0.184 9~0.811 2。

各群体中, 丹东群体的遗传多样性最低, 荣成群体最高, 见表 4。对 5 个群体的无偏倚杂合度期望值 (H_e) 进行 Kruskal-Wallis 检验, 差异不显著 ($H=0.672$, $df=4$, $P=0.955$)。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

5 个群体各位点的基因分化系数 (G_{ST}) 和基因流 (N_m) 见表 5, 各群体之间存在轻度遗传分化 ($G_{ST}<0.05$) 的位点有 6 个; 有中度遗传分化 ($0.05<G_{ST}<0.15$) 的位点有 7 个; 有较大遗传分化 ($0.15<G_{ST}<0.25$) 的位点有 2 个; 存在很大的遗传分化 ($G_{ST}>0.25$) 的位点有只有 *Poli6TUF*。各群体平均的基因分化系数为 0.0991, 表明 9.91% 的遗传分化来自群体间, 90.09% 的遗传分化来自群体内。 N_m 与 G_{ST} 是负相关的, 因此基因流所反映的群体遗传分化与基因分化系数是类似的。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 *Poli117TUF*、*Poli147TUF*、*Poli23TUF*、*Poli132TUF*、*Poli130TUF*、*Poli9TUF*、*Poli19TUF*、*Poli9-8TUF*、*Poli11TUF*; 在群体间分化较大 ($N_m<1$) 的位点有 *Poli6TUF*、*Poli30TUF*, 其余位点在 5 个位点在各群体之间存在一定程度的分化。

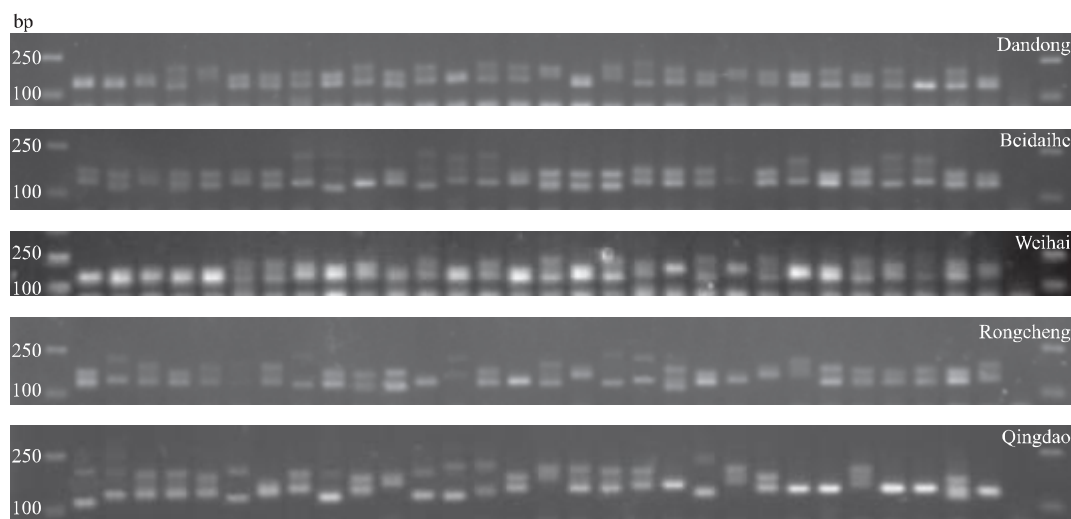


图 1 微卫星位点 *Poli130TUF* 在牙鲆 5 个群体所有采样个体中的扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis patterns of microsatellite locus amplified by primer *Poli130TUF* in 5 cultured stocks

表 3 牙鲆的 3 个养殖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、无偏杂合度期望值、多态信息含量
Tab.3 Number of alleles (A), number of effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), unbiased expected heterozygosity (H_e) and PIC at the 16 microsatellite loci in cultured stocks of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

位点 Locus	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
<i>Poli6TUF</i>	3	2.7508	0.3533	0.6365	0.5704
<i>Poli30TUF</i>	4	2.4586	0.4867	0.5933	0.5371
<i>Poli117TUF</i>	3	1.5413	0.3533	0.3512	0.2963
<i>Poli123TUF</i>	9	4.5281	0.6933	0.7792	0.7585
<i>Poli131TUF</i>	4	2.4844	0.3533	0.5975	0.5487
<i>Poli147TUF</i>	6	4.0114	0.6867	0.7507	0.7405
<i>Poli23TUF</i>	7	5.2497	0.72	0.8095	0.7964
<i>Poli141TUF</i>	9	4.6206	0.5333	0.7836	0.774
<i>Poli132TUF</i>	8	4.6083	0.7667	0.783	0.7724
<i>Poli130TUF</i>	7	4.9922	0.8	0.7997	0.7852
<i>Poli9TUF</i>	7	4.4973	0.5133	0.7776	0.7603
<i>Poli19TUF</i>	2	1.2596	0.22	0.2061	0.1849
<i>Poli9-8TUF</i>	6	3.0187	0.7267	0.6687	0.6575
<i>Poli18TUF</i>	7	3.9533	0.5867	0.747	0.7198
<i>Poli11TUF</i>	6	3.5785	0.68	0.7206	0.7043
<i>Poli13TUF</i>	9	5.5161	0.4933	0.8187	0.8112

表 4 牙鲆 5 个养殖群体在 16 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

Tab.4 Number of alleles (A), number of effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), unbiased expected heterozygosity (H_e) and PIC at the 16 microsatellite loci in 5 cultured stocks of Japanese flounder

群体 Population	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
丹东 Dandong	4.4375	2.9663	0.5146	0.5587	0.5274
北戴河 Beidaihe	4.5	3.2001	0.6354	0.6031	0.5607
威海 Weihai	4.3125	4.3125	0.5063	0.6059	0.5476
荣成 Rongcheng	4.5	3.2966	0.5417	0.6482	0.5971
青岛 Qingdao	4.6875	3.1036	0.6042	0.631	0.5812
平均 Average	4.4875	3.3758	0.5604	0.6094	0.5628

表 5 牙鲆养殖群体各位点的基因分化系数 G_{ST} 和 基因流 N_m

Tab.5 Coefficient of gene differentiation G_{ST} and Gene flow N_m among cultured stocks in Japanese flounder

位点 Locus	G_{ST}	N_m	位点 Locus	G_{ST}	N_m
<i>Poli6TUF</i>	0.4644	0.2883	<i>Poli132TUF</i>	0.0568	4.1544
<i>Poli30TUF</i>	0.2336	0.8201	<i>Poli130TUF</i>	0.0287	8.4760
<i>Poli117TUF</i>	0.0524	4.5214	<i>Poli9TUF</i>	0.0394	6.0941
<i>Poli123TUF</i>	0.1083	2.0585	<i>Poli19TUF</i>	0.0356	6.7765
<i>Poli131TUF</i>	0.1728	1.1965	<i>Poli9-8TUF</i>	0.0315	7.6859
<i>Poli147TUF</i>	0.0502	4.7267	<i>Poli18TUF</i>	0.1260	1.7335
<i>Poli23TUF</i>	0.0310	7.8236	<i>Poli11TUF</i>	0.0421	5.6886
<i>Poli141TUF</i>	0.0809	2.8420	<i>Poli13TUF</i>	0.0682	3.4166
平均 Average	0.0991	2.2715			

根据 Nei 的计算方法^[10] 计算了各群体间的遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I) (表 6)。威海和荣成的遗传距离最近 (0.099 2), 丹东与青岛的遗传距离最远 (0.300 8)。

根据各群体之间的遗传距离, 对 5 个养殖群体进行聚类 (图 2)。5 个群体主要分为 3 类, 丹东和北戴河各为一类; 威海与荣成的遗传距离较小, 首先聚类, 再与青岛群体构成另一类。

表 6 遗传距离及相似性系数
Tab.6 Nei's genetic identity (I) and distance (D) in 5 stocks of Japanese flounder

	丹东 Dandong	北戴河 Beidaihe	威海 Weihai	荣成 Rongcheng	青岛 Qingdao
丹东 Dandong	—	0.8172	0.7694	0.8057	0.7402
北戴河 Beidaihe	0.2019	—	0.7704	0.8414	0.6832
威海 Weihai	0.2622	0.2609	—	0.9056	0.8201
荣成 Rongcheng	0.2161	0.1727	0.0992	—	0.8313
青岛 Qingdao	0.3008	0.3810	0.1984	0.1848	—

注: 对角线以下为遗传距离; 对角线以上为遗传相似性系数。

Note: Below the diagonal is genetic identity and above is the genetic distance.

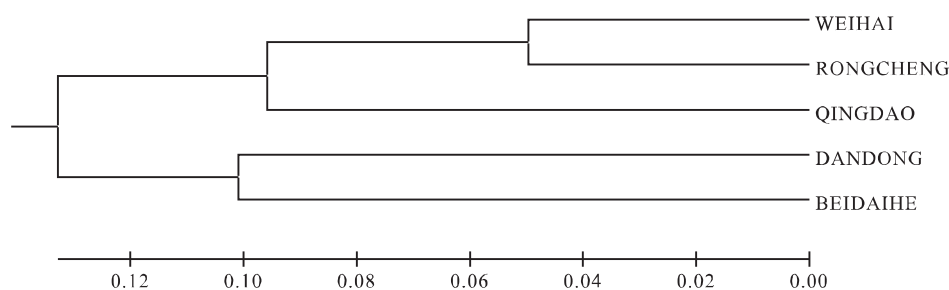


图 2 采用 UPGMA 聚类法构建的分支图

Fig.2 Dendrogram of 5 cultured populations of Japanese flounder by UPGMA cluster analysis

2.3 Hardy-Weinberg 平衡

对 16 个微卫星位点的等位基因频率与 Hardy-Weinberg 平衡的 χ^2 拟合度检验, 各位点的遗传偏离指数 (d), 结果见表 7。

5 个群体当中, 丹东和青岛群体偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点较少, 分别各有 7 个位点, 其余 3 个群体都各有 10 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡。威海、荣成、青岛 3 个群体表现出杂合子缺失的位点较多, 分别有 10、6、8 个位点, 丹东和威海表现为杂合子缺失的位点较少, 分别有 4 和 3 个, 而且表现为杂合子缺失和杂合子过度的位点在各群体之间有很大的差异。

3 讨论

遗传多样性是鱼类生物多样性的的重要组成部分, 它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 的变化直接反映了物种遗传变异的程度。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^[11]。本研究所使用的 16 个微卫星位点之中, 除 *Poli19TUF* 表现为低度多态, *Poli117TUF* 表现为中度多态以外, 其余 14 个位点都表现为高度多态, 可以广泛应用于牙鲆养殖群体的遗传监测及家系选育中的系谱分析。在 5 个群体中, 平均 PIC 为 0.527 4~0.597 1, 由小到大依次为丹东、威海、北戴河、青岛、荣成, 各群体都表现为高度多态性。表明这 5 个养殖群体种群内遗传变异较大, 信息含量较高。

杂合度能反映各群体在多个位点上的遗传变异, 是度量群体遗传变异的一个最适参数^[12]。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。Sekino^[1] 采用 11 对微卫星引物对日本 3 个养殖群体进行检测, 其杂合度为 0.59 ~ 0.71, 王伟等^[4] 对山东牙鲆养殖群体检测

的杂合度为 0.731 0。本研究采用 16 个微卫星座位检测 5 个养殖群体的平均无偏倚杂合度期望值为 0.558 7~0.6482, 平均为 0.609 4, 比前面提到的研究结果略低。分析其原因, 主要是由于采用的微卫星引物不同所致。5 个群体的平均无偏倚杂合度期望值由小到大依次为: 丹东、北戴河、威海、青岛、荣成。对各群体各位点的无偏倚杂合度期望值进行 Kruskal-Wallis 检验, 其结果 ($H=0.672$, $df=4$,

$P=0.955$) 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^[13]。本研究结果表明目前各养殖群体的遗传多样性尚属比较乐观, 均具有比较大的育种潜力。

表 7 χ^2 显著性检验 (P) 与遗传偏离指数 (d)Tab.7 P value of Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium and d value of heterozygote deficiency or excess

位点 Locus	丹东 Dandong		北戴河 Beidaihe		威海 Weihai		荣成 Rongcheng		青岛 Qingdao	
	P	d	P	d	P	d	P	d	P	d
<i>Poli6TUF</i>	0.8801	0.0305	0.0000**	0.4737	0.4419	-0.1321	0.0000**	-0.0179	0.3187	-0.1986
<i>Poli30TUF</i>	0.4412	0.0759	0.6522	0.1346	0.4749	0.0311	0.8362	0.0658	0.5744	0.118
<i>Poli117TUF</i>	0.0304	0.3455	0.0795	-0.3333	0.5632	0.085	0.0795	-0.3333	0.3509	0.1438
<i>Poli123TUF</i>	0.0001**	0.095	0.0001**	-0.0302	0.0059**	-0.2084	0.0000**	0.0762	0.2102	0.0685
<i>Poli131TUF</i>	1		0.0000**	0.1073	0.0008**	0.3152	0.0000**	0.5914	0.0000**	0.1633
<i>Poli147TUF</i>	0.0009**	0.393	0.0006**	0.2087	0.3932	0.0505	0.1368	0.006	0.0001**	0.2897
<i>Poli23TUF</i>	0.0009**	0.1411	0.0637	-0.0924	0.0081**	0.3727	0.0413*	0.1961	0.1596	-0.1932
<i>Poli141TUF</i>	0.0000**	0.4733	0.0075**	0.2655	0.0088**	0.4103	0.0001**	0.4574	0.2051	-0.2664
<i>Poli132TUF</i>	0.0357*	-0.0543	0.0019**	-0.2335	0.0404*	0.1025	0.1661	-0.0949	0.1536	0.095
<i>Poli130TUF</i>	0.3061	0.0136	0.0001**	0.2455	0.0132*	0.0108	0.0025**	0.0128	0.0187*	0.0902
<i>Poli9TUF</i>	0.0000**	0.3539	0.0024**	0.2344	0.1361	0.2157	0.0000**	0.5937	0.0000**	0.6675
<i>Poli19TUF</i>	0.5632	0.085	1	-	0.3655	-0.1765	0.5062	-0.1321	0.302	-0.2
<i>Poli9-8TUF</i>	0.0943	-0.4896	0.0000**	-0.2329	0.0000**	0.0491	0.0000**	0.0816	0.0152*	-0.0928
<i>Poli18TUF</i>	0.6294	0.1803	0.2225	0.3305	0.0089**	0.05	0.0001**	0.5427	0.2534	0.0462
<i>Poli11TUF</i>	0.1484	0.0679	0.0899	0.0793	0.0078**	0.274	0.0027**	0.0469	0.0014**	0.2
<i>Poli13TUF</i>	0.0002**	0.3379	0.0000**	0.2899	0.0000**	0.6404	0.2161	0.2394	0.0078**	0.2651

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

导致群体间分化的遗传分化变异系数 (G_{ST}) 的值变化从 1 到 0。当群体的所有等位基因频率几乎相同时, G_{ST} 的值接近于 0, 各群体间几乎没有分化; 当群体间的遗传分化增大时, 说明遗传多样性几乎存在于各群体之间, G_{ST} 的值接近于 1。5 个牙鲆养殖群体的微卫星座位遗传分化变异系数 (G_{ST}) 为 0.099 1, 表明各群体之间存在中度的遗传分化。You 等^[3] 分析山东近海野生和养殖群体的遗传变异 (G_{ST}) 为 0.119%。由此可见, 5 个养殖群体间的遗传变异与野生群体和养殖群体间的变异程度是相似的。5 个养殖群体在系统发生中可以分为 3 个大类。在山东的 3 个养殖群体中, 威海和荣成群体的分化最小。黎中宝^[5] 曾用等位酶技术对青岛和威海野生牙鲆 F_1 代的遗传结构进行分析, 结果证明

2 个群体来源于同一种群。而在本研究中, 威海与青岛群体虽出现了一定程度的分化, 但这是相对于荣成群体而言。相对于北戴河和丹东群体来讲, 山东三群体基本上是共同的起源。

由于中国牙鲆养殖历史尚短, 繁殖群体主要来自野生群体, 而不同地区间野生亲鱼的引进和交流也是比较频繁的。比如北戴河中心试验站的多数亲鱼采自秦皇岛沿海, 但也有少部分采自黄海。在北戴河站牙鲆的后代中, 渤海群体和黄海群体也会出现血液交流, 但是目前还不足以影响其遗传多样性产生较大改变。

Crawford 等^[14] 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。本文分析牙鲆养殖群体所得的聚类结果不仅基本符合5个养殖群体的地域分布和养殖历史,也反映出各群体的遗传多样性比较丰富,并具有一定的遗传分化,因此应该在育苗和养成过程中,一方面保护好现有的基因库,另一方面也要充分利用其遗传多样性,挖掘其育种潜力。

参考文献:

- [1] Sekino M, Hara M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2002, 213: 101-122.
- [2] 尤锋,王可玲,相建海,等. 山东近海褐牙鲆自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(5): 512-518.
- [3] You F, Xiang J H, Song L S, et al. Genetic variations in natural and cultured stocks of Shandong *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) as revealed by RAPD [J]. *Studia Marina Sinica*, 2002, 44: 228-234.
- [4] 王伟,尤锋,高天翔,等. 山东近海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(6): 530-537.
- [5] 黎中宝. 牙鲆养殖群体遗传结构的研究 [J]. *海洋学报*, 2004, 26(3): 102-108.
- [6] 邹曙明,李思发,蔡完其. 牙鲆和大菱鲆群体的分子标记和遗传变异 [J]. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 6-9.
- [7] Coimbra M R M, Hasegawa O, Kobayashi K, et al. Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish Sci*, 2001, 67: 358-360.
- [8] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2003, 220: 203-218.
- [9] Nei M. *Molecular population genetics and evolution* [M]. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1975, 79-124.
- [10] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [11] Allendorf F W, Ryman N. Genetic management of hatchery stock [M]// *Population genetics and fishery management*. Seattle: University of Washington Press, 1987: 141-159.
- [12] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. *Evolution*, 1975, 29: 1-10.
- [13] 廖信军,常洪,孙伟,等. 利用微卫星标记对六个羊群体性的研究 [J]. *家畜生态学报*, 2006, 27(2): 13-18.
- [14] Crawford A M, Little Pohn R P. The use of DNA marker in deciding conservation priorities in sheep and other livestock [J]. *Animal Genetic Resources Information*, 1998, 23: 21-26.

Analysis of genetic structure among 5 cultured stocks of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

LIU Hai-jin¹, ZHU Xiao-chen², SUN Xiao-wen³, XUE Ling-ling¹, ZHAO Ying-ying⁴, MAO Lian-ju⁵

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China; 2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China; 3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 4. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 5. Life Science and Technology Institute, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Genetic divergence within and between 5 cultured stocks (Dandong, Beidaihe, Weihai, Rongcheng and Qingdao) of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) was assessed by 16 microsatellite loci which in the 5 cultured populations showed allele number (A) was 2 to 9; average allele number was 6.062 5; effective allele number (N_e) was 1.259 6–5.516 1; average effective allele number was 3.692; observed heterozygosity value (H_o) is 0.2200 to 0.8000; expected heterozygosity value (H_e) was 0.206 1 to 0.818 7. H_e values followed the order of Dandong, Beidaihe, Weihai, Qingdao, Rongcheng, and a comparison by Kruskal-Wallis test revealed that there was no significant difference in genetic diversity of the 5 cultured stocks ($H=0.672$, $df=4$, $P=0.955$). The results also showed that the coefficient of gene differentiation between the stocks (G_{ST}) was 0.0991, there were moderate genetic differentiation among these 5 cultured populations. The genetic distance of 5 cultured populations was calculated and the cluster analysis by UPGMA method was carried out that all populations were pooled into three groups: Dandong, Beidaihe and Shandong (including Weihai, Rongcheng and Qingdao). Among the 3 populations of Shandong, Weihai and Rongcheng were more similar. Hardy-Weinberg equilibrium analysis in 16 microsatellite loci by Chi Square test and genetic deviation index (d) showed a remarkable difference in populations. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 30–37]

Key words: Japanese flounder; cultured population; genetic diversity; microsatellite