

DOI: 10.12264/JFSC2020-0285

## 基于微卫星标记的许氏平鲷卵巢不同分区子代多重父权分析

罗芷晴<sup>1</sup>, 董建宇<sup>1</sup>, 张宗航<sup>1</sup>, 徐秀文<sup>1</sup>, 张秀梅<sup>2,3</sup>

1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

**摘要:** 许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)具有特殊的卵胎生繁殖模式和长期储存精子的特性。虽然先前有关于许氏平鲷多重父权的研究报道, 但关于交配后雌鱼卵巢内子代的父权分布尚未有报道。本研究选取已纳精的雌性许氏平鲷为实验对象, 采用6个高度多态的微卫星位点对9尾雌鱼卵巢前部(靠近泄殖孔端)、中部、后部(远离泄殖孔端)3个分区的子代(共291个)进行父权分析。结果显示: (1) 9尾雌鱼中有8尾(88.89%)检测到了多重父权现象, 平均父权数3.56。其中4个母本子代群(50%,  $B>0$ )的各父本贡献率存在不同程度的偏倚; (2) 单因素方差分析结果显示, 父本在雌鱼卵巢3个分区的子代比例差异不显著; (3) 卡方均匀分布检验结果显示, 每个母本卵巢各分区的父权分布均无显著偏倚, 表明许氏平鲷卵巢内子代多重父权随机分布。分析认为, 交配时雌鱼卵巢尚未发育成熟, 来自不同雄性的精子在细小的卵巢内得以充分混合并储存于卵巢中, 雄性精子数量与精子活性的差异可能是导致父权贡献率发生偏倚的重要原因。研究结果进一步丰富了许氏平鲷繁殖生物学研究内容。

**关键词:** 多重父权; 多次交配; 子代分布; 微卫星; 平鲷属

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)04-0391-12

多重父权是指雌性动物在同一发情期内与多个雄性个体交配, 产下的同一批子代群体拥有多个父本的现象<sup>[1-2]</sup>。关于该适应机制产生的原因, 相关学者提出了许多假说, 包括受精保证、营养物质的获取、增加遗传多样性和减少遗传不亲和性等<sup>[3-4]</sup>。在卵胎生平鲷属鱼类中, 多重父权是一种普遍现象<sup>[5-7]</sup>。明晰其多次交配模式的特征, 对理解交配繁殖策略至关重要<sup>[8]</sup>。目前, 许多研究报道了水生动物的多重父权<sup>[9-12]</sup>, 却较少有研究关注多重父权在雌性卵巢中的分布模式。在一些昆虫种类如地中海果蝇(*Ceratitis capitata*)和黄粪蝇(*Scatophaga stercoraria*)中, 来自不同雄性的精子往往储存于雌性不同的精子储存器官中或层化分布于精子储存器官中, 雌性通过对不同雄性精子

的选择性利用, 以增加其对后代父系的控制<sup>[13-14]</sup>。在水生生物中, Naud 等<sup>[15]</sup>开展了枪乌贼(*Loligo reynaudii*)父权在卵链中的空间分布模式研究, 发现部分卵链前后区域呈现明显的父系转换。对海龙属物种如舒氏海龙(*Syngnathus schlegelii*)研究表明, 雄性封闭育儿袋内的母权沿育儿袋前后轴分开排列<sup>[16-17]</sup>。而在娥螺(*Busycon carica*)和脉红螺(*Rapana venosa*)中, 不同雄性的子代随机分布于卵链上或卵囊中<sup>[12,18]</sup>。在平鲷属鱼类中, 多重父权在卵巢内的空间分布特征尚未有研究报道。

许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)隶属于鲷形目(Scorpaeniformes)、鲷科(Scorpaenidae)、平鲷属(*Sebastes*), 是我国北方近海重要经济鱼种, 营卵胎生繁殖<sup>[19]</sup>。许氏平鲷性成熟雌鱼和雄鱼于每年

收稿日期: 2020-09-03; 修订日期: 2020-10-24.

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓海洋牧场”重点专项(2019YFD0901303); 国家自然科学基金项目(32072966, 41676153).

作者简介: 罗芷晴(1997-), 女, 硕士研究生, 专业方向为渔业资源增殖学. E-mail: lzq2718@163.com

通信作者: 张秀梅, 教授, 专业方向为鱼类行为生态学、渔业资源保护学及增殖生态学. E-mail: xiumei1227@163.com

11—12 月交配, 交配后精子储存于卵细胞周围的透明带中<sup>[20]</sup>, 待翌年 2—3 月卵细胞成熟后精卵结合形成受精卵; 随后受精卵经过 50 d 左右的体内发育形成仔鱼, 然后被产出体外<sup>[21]</sup>。在胚胎发育期间雌性卵巢内部含有大量凝胶状物质, 使得胚胎的在卵巢中的位置相对固定且不易分散<sup>[21]</sup>。因其特殊的繁殖习性和较高的经济价值, 国内外学者开展了大量关于许氏平鲷繁殖生物学研究, 目前相关研究主要集中在性腺发育<sup>[22-23]</sup>、精子储存<sup>[20,24]</sup>、繁殖相关基因表达<sup>[25-26]</sup>等方面。关于多雄交配的遗传学研究, 已有研究表明许氏平鲷多重父权频率高且养殖群体比野生群体具有更高的父本数量<sup>[27-28]</sup>, 但目前有关雌性卵巢内多重父权的空间分布特征等尚未见报道。

因此, 实验选取许氏平鲷养殖群体作为研究对象, 通过微卫星标记技术分析了纳精雌鱼卵巢不同部位子代的多重父权频率与父权分布, 初步探究了交配后精子在卵巢内的分布, 以为丰富许氏平鲷繁殖生物学研究内容提供理论基础与数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品处理

实验于 2019 年 5 月 24 日购买大连大型网箱养殖的许氏平鲷怀卵雌鱼共 9 尾(养殖密度 7~8 尾/m<sup>3</sup>), 运回实验室后置于 MS-222 中进行麻醉处理。分析记录生物学性状(包括全长、体长、体重), 测量纯重、肝重、性腺重, 计算雌鱼肥满度。

$$K=(100W)/L^3$$

式中,  $K$  为肥满度,  $W$  为纯重(g),  $L$  为体长(cm)。

取雌鱼腹部部分肌肉于 95%酒精中固定并于 -20 °C 冰箱内保存备用。

因许氏平鲷卵巢内含有凝胶状物质, 其胚胎不易分散<sup>[21]</sup>。实验将其左右卵巢均分为三部分, 其中, 靠近泄殖孔一端为前端, 中部为中端, 远离泄殖孔一端为后端(图 1)。分区后, 同区内胚胎于培养皿中用小勺子均匀混合后随机选取部分胚胎于 95%酒精中固定, 样品于 -20 °C 冰箱内保存以备后续测定<sup>[27,29]</sup>。用 Nikon SMZ1000 变焦体视显微镜对卵巢左右各分区许氏平鲷胚胎拍照, 判

定其发育阶段并用 ImageJ 软件测量胚胎体长。同时, 取部分鱼卵称重并计数, 3 次重复以估算每尾雌性的怀卵量。最后取出左右耳石以估算雌鱼年龄。

### 1.2 DNA 提取

基于此前报道<sup>[27]</sup>和本研究预实验发现, 许氏平鲷左右卵巢的父权分布一致, 实验于 9 尾雌鱼的左卵巢各分区随机选取 12 个胚胎用以提取基因组 DNA(共 324 个胚胎)。基因组 DNA 的提取分两种方法进行。取母本肌肉组织用细胞裂解液 STE 和蛋白酶 K 完全消化后, 根据传统的酚氯仿抽提法提取母本基因组 DNA, 晾干后将 DNA 模板溶解于 100 μL TE 缓冲液中 4 °C 保存备用; 胚胎基因组 DNA 利用 Lysis Buffer<sup>[30]</sup> (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 0.5% Tween-20, 500 μg/mL Proteinase K)提取, 将胚胎从酒精中取出, 用滤纸吸干多余酒精后, 置于 0.2 mL PCR 管中, 迅速加入 50 μL 裂解液, 在 65 °C 的条件下孵育 1 h 后, 在 95 °C 下孵育 15 min, 缓慢振荡混匀后在超速离心机中以 3000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液于 4 °C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增及基因分型

从已发表文献中筛选出 6 对高度多态的微卫星引物(Sra.7-7、SSC12、SSC23、SSC51、SSC69、KSs7)<sup>[27,31]</sup>, 用荧光标记基团(HEX、FAM、TAM)修饰上游引物的 5'端合成荧光标记引物。以 9 尾雌鱼及每尾雌鱼卵巢 3 个分区随机选取的 12 个胚胎(共 324 个胚胎)的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。随机选取 45 个胚胎样本以检测多态性, 利用 Cervus 3.0 进行 6 对微卫星引物的等位基因数( $N_a$ )、表观杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )、多态信息含量(PIC)计算及“哈迪-温伯格”平衡(HWE)检测(表 2)。

PCR 反应体系的体积为 25 μL, 其中包括 10×PCR Buffer 2.5 μL, 2 mmol/L dNTPs 2 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 双蒸水 17.5 μL。PCR 循环参数为: 94 °C 变性 5 min, 每次反应进行 35 个循环, 每个循环包括: 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s (各引物退火温度见表 1), 72 °C 延伸 45 s, 循环完成后 72 °C 变性

10 min, 然后 4 °C 恒温保存。

PCR 产物与含 Hi-Di 甲酰胺的内标 GS 500-1-old size standards 混合变性后, 在 ABI PRISM 3730 DNA 测序仪(ABI, USA)上进行电泳检测。使用软件 GeneMarker v202 读取相关的等位基因数值并加以人工校正后, 获得各样品基因分型结果。为避免光线直射对实验结果产生影响, 所有实验过程均在光线较弱的场所进行。

#### 1.4 数据分析

实验选取软件 COLONY 2.0 对所获得的微卫星数据进行多重父权分析<sup>[32]</sup>。COLONY 2.0 基于最大似然法进行亲本分析、谱系构建以及亲本基因型的重构。研究将母本与子代基因分型结果纳入多重父权分析中, 设定 0.02 的分型错误率, 在母系关系已知的情况下, 以 3 个不同的随机数种子进行 3 次重复运算进行父权分析。通过 SKEW CALCULATOR 2003 (<http://www.eeb.ucla.edu/Faculty/Nonacs/PI.htm>) 计算二项式偏差指数  $B$ , 并以此评估不同父本的生殖倾斜程度<sup>[33]</sup>。若  $B$  值为零, 则表示不同父本的子代随机分布; 若  $B$  值为正, 则表示父本贡献有偏差; 若  $B$  值为负, 则表示后代很可能为均等分布。采用 SPSS19.0 进行数据统计和分析。用单因素方差(one-way ANOVA) 和 Duncan 多重比较分析父本在雌鱼卵巢不同分区(前部、中部、后部)的子代比例的差异显著性。其中父本在各卵巢分区的子代比例计算参照以下公式:

$$P=O_i/O$$

式中,  $P$  为父本在各卵巢分区的子代比例,  $O_i$  为父

本在卵巢各分区(前/中/后)子代的数量,  $O$  为父本的子代数量。

同时通过卡方均匀分布检验, 单独分析每尾雌鱼卵巢各分区的父权分布情况。由于采样过程中, 其中一尾雌鱼卵巢后部未受精卵子较多, 因此在上述父本单因素方差分析(父本在雌鱼卵巢不同分区子代占比)和卡方均匀分布检验(雌鱼卵巢不同区域的父权分布情况)中不包括该尾鱼( $F_9$ )。雌鱼体长、体重与怀卵量的相关性用 Pearson 相关系数( $r$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 怀卵雌鱼的生物学特征

9 尾怀卵雌性许氏平鲈的年龄范围为 3~4 龄, 平均为 3.56 龄; 体重范围为 840.5~1434.7 g, 平均体重为(1059.8±177.68) g; 体长范围介于 30.3~33.85 cm 之间, 平均体长为(32.43±1.96) cm, 绝对怀卵量介于 93267~200249 之间, 平均为 143363.10±30633.98; 肥满度介于 1.99~2.66 之间, 平均为 2.250±0.23 (表 1)。同一个体卵巢内胚胎发育进程相当, 而不同个体的胚胎发育进程有所不同, 其中  $F_1$ ~ $F_8$  母本体内胚胎位于破膜期,  $F_9$  母本体内胚胎位于口和肛门打开期<sup>[34-35]</sup>(图 1), 胚胎体长介于 3.40~5.22 mm 之间, 平均为(4.13±0.48) mm。样本绝对怀卵量与体长、体重显著正相关(体长:  $r=0.697, P<0.05$ ; 体重:  $r=0.532, P<0.05$ )。

### 2.2 多重父权分析

基于 Cervus 3.0 软件对基因分型结果进行分

表 1 采样群体相关生物学指标

Tab. 1 Biological characteristics of sampled *Sebastes schlegelii* population

| 母本<br>female | 体长/cm<br>body length | 体重/g<br>body weight | 纯重/g<br>net weight | 肝重/g<br>liver weight | 性腺重/g<br>ovary weight | 绝对怀卵量<br>brood amount | 肥满度<br>condition factor | 年龄<br>age      |
|--------------|----------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------|
| $F_1$        | 33.80                | 1198.00             | 815.10             | 22.82                | 249.78                | 163589                | 2.11                    | 4 <sup>+</sup> |
| $F_2$        | 31.20                | 984.60              | 696.80             | 15.40                | 210.00                | 113857                | 2.29                    | 3 <sup>+</sup> |
| $F_3$        | 31.70                | 915.10              | 633.00             | 15.40                | 214.29                | 127642                | 1.99                    | 3 <sup>+</sup> |
| $F_4$        | 36.60                | 1434.70             | 1039.30            | 40.02                | 271.12                | 200249                | 2.12                    | 4 <sup>+</sup> |
| $F_5$        | 31.20                | 1026.00             | 808.90             | 17.73                | 178.91                | 140034                | 2.66                    | 4 <sup>+</sup> |
| $F_6$        | 31.50                | 944.40              | 702.90             | 19.27                | 132.75                | 93267                 | 2.25                    | 3 <sup>+</sup> |
| $F_7$        | 33.85                | 1075.90             | 781.90             | 17.73                | 175.91                | 146604                | 2.02                    | 3 <sup>+</sup> |
| $F_8$        | 30.30                | 840.50              | 625.50             | 9.55                 | 175.24                | 157310                | 2.25                    | 4 <sup>+</sup> |
| $F_9$        | 31.70                | 1119.00             | 814.60             | 22.84                | 185.55                | 147716                | 2.56                    | 4 <sup>+</sup> |

析, 结果显示微卫星位点等位基因数( $N_a$ )在 8~17 之间, 平均为 12; 观测杂合度( $H_o$ )平均为 0.907, 期望杂合度( $H_e$ )平均为 0.844; 6 个微卫星位点均为高度多态<sup>[36]</sup>, 多态信息含量(PIC)平均为 0.817;

一方亲本已知的非排除概率(NE-1P)为 0.173~0.573, 6 个基因座均符合哈迪温伯格平衡, 未观察到无效等位基因及连锁不平衡(表 2)。

采用 6 对微卫星位点对 9 尾雌性及 324 个胚

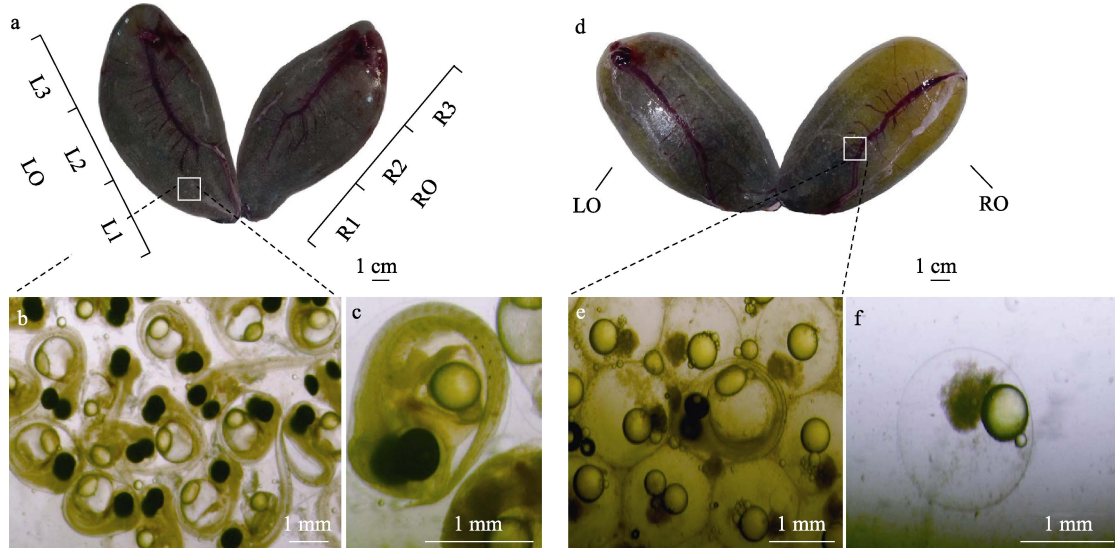


图 1 许氏平鲈雌鱼卵巢与子代

a: 正常发育的卵巢; b, c: 破膜期仔鱼; d: 雌鱼 F<sub>0</sub> 部分发育的卵巢; e: 位于口和肛门打开阶段的胚胎; f: 未受精卵;  
LO: 雌性左卵巢, RO: 雌性右卵巢. L1、L2、L3 分别表示左卵巢靠近泄殖孔区、中区与远离泄殖孔区;  
R1, R2, R3 分别表示右卵巢靠近泄殖孔区、中区与远离泄殖孔区。

Fig. 1 Ovary and offspring of female *Sebastes schlegelii*

a: normally filled ovaries; b and c: embryos at prehatching stage; d: unfilled ovary; e: embryos at openings of the mouth and anus stage; f: unfertilized eggs; LO: left ovary; RO: right ovary. L1, L2 and L3 represent the distal, middle and proximal part from the cloacal orifice in left ovary, respectively; R1, R2 and R3 represent the distal, middle and proximal part from the cloacal orifice in right ovary, respectively.

表 2 研究所用 6 对微卫星引物及荧光标记信息

Tab. 2 Information for 6 microsatellite loci and primers in multiple paternity study of *Sebastes schlegelii*

| 位点<br>locus | 重复<br>片段<br>repeat<br>motif               | 引物序列<br>primer sequence                                     | 片段大<br>小/bp<br>size<br>range | 退火温<br>度/°C<br>$T_a$ | 等位基<br>因数<br>$N_a$ | 观测杂<br>合度<br>$H_o$ | 期望杂<br>合度<br>$H_e$ | 多态信<br>息含量<br>PIC | 非排除<br>概率<br>NE-1P | 登录号<br>accession<br>no. |
|-------------|---|---|------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| KSs7        | (GT) <sub>16</sub>                        | F: FAM-TGGGCAATAAATAAGAGAGGA<br>R: CCGTCTGCAATCTGACTCA      | 174-230                      | 54                   | 15                 | 0.922              | 0.909              | 0.897             | 0.192              | EF109806<br>(GenBank)   |
| SSC<br>12   | (AC) <sub>20</sub>                        | F: HEX-AACACGCTGAACAGAGAACAAA<br>R: GCTCCGACTATAGCTGGTCCTA  | 152-238                      | 59                   | 10                 | 0.984              | 0.793              | 0.754             | 0.404              | AB058405<br>(DDBJ)      |
| SSC<br>23   | (TG) <sub>21</sub>                        | F: TAM-AGTGTCATGCCCTCTTCCAG<br>R: CACTCGGCATTCTCACCTCA      | 177-279                      | 57                   | 16                 | 0.762              | 0.891              | 0.874             | 0.229              | AB058406<br>(DDBJ)      |
| SSC<br>51   | (GT) <sub>20</sub> T<br>(TG) <sub>5</sub> | F: HEX-GTGCTGATGGAAAACACTACCA<br>R: GTGACCTTTCCTGAACACACT   | 168-264                      | 57                   | 8                  | 0.844              | 0.723              | 0.675             | 0.513              | AB058407<br>(DDBJ)      |
| SSC<br>69   | (GT) <sub>13</sub>                        | F: FAM-GGCACCGAGCTCAACCTTACTG<br>R: TGCTGTGACTATTTCCCTCTGGC | 138-160                      | 57                   | 7                  | 0.946              | 0.828              | 0.797             | 0.355              | AB058408<br>(DDBJ)      |
| Sra.<br>7-7 | (CA) <sub>12</sub>                        | F: TAM-GCATGAAAGTGTATGAAAGGC<br>R: CATGTGATTCTGTGCTAACTGAG  | 195-220                      | 57                   | 17                 | 0.984              | 0.921              | 0.908             | 0.173              | AF269055<br>(GenBank)   |

注: FAM 为蓝色荧光标记, TAM 为绿色荧光标记, HEX 为黑色荧光标记. 引物 SSC12、SSC23、SSC51、SSC69、Sra.7-7 来源于 Gao 等<sup>[27]</sup>, 引物 KSs7 来源于 An 等<sup>[31]</sup>.

Note: Fluorescent dye labels (ABI): FAM (blue), TAM (green), HEX (black). The sequences of primer SSC12, SSC23, SSC51, SSC69 and Sra.7-7 were from Gao, et al.<sup>[27]</sup>, the sequences of primer KSs7 was from An<sup>[31]</sup>.

胎进行了基因分型, 其中因部分胚胎(33 个)基因扩增结果较差未纳入后续父权分析, 研究通过 COLONY 软件共对 291 个胚胎基因分型结果及 9 尾雌鱼进行了亲子模拟分析。在实验所用 9 尾网箱养殖雌鱼的子代群中, 8 个子代群(88.89%)中检测到多重父权现象, 每一尾雌鱼有 1~7 个不同的雄性对其有贡献, 平均为 3.56 个雄性(图 2, 表 3)。在 8 个具多重父权的母本及子代群中, 4 个子代群(50%,  $B>0$ )的父本贡献率存在偏倚(表 3)。

在 8 个具多重父权的母本及子代群中, 各父本在母本卵巢各分区父权贡献率占比如图 3 所示。单因素方差分析结果显示, 在具多重父权的母本中( $F_1\sim F_8$ ), 父本在雌鱼卵巢 3 个分区的子代比例无显著性差异(图 4), 其中父本在靠近生殖孔一端的子代比例略高于中部和远离生殖孔一端。

为进一步确认每个个体卵巢中的父权分布情况, 采用卡方均匀分布检验, 单独对每尾雌鱼( $F_1\sim F_8$ )卵巢各分区的父权分布进行分析, 结果表明父权分布均无偏倚(表 3)。

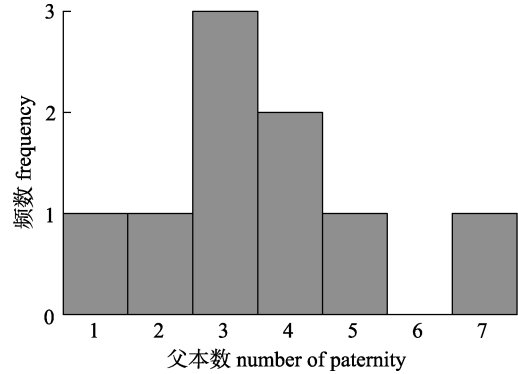


图 2 许氏平鲈母本及子代微卫星父权分析结果  
Fig. 2 Microsatellite parentage analysis of *Sebastes schlegelii*

表 3 许氏平鲈卵巢各分区子代父权分布状况

Tab. 3 Distribution of embryos sired by different males in different regions of the ovary of *Sebastes schlegelii*

| 母本 female                 | 分区 region | 测序子代数 genotyped offspring | 父本数 number of sires | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | B            | P     |
|---------------------------|-----------|---------------------------|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|--------------|-------|
| $F_1$<br>$\chi^2 P=0.999$ | L1        | 12                        | 5                   | 4  | 1  | 2  | 3  | 2  |    |    | -0.031       | 0.806 |
|                           | L2        | 10                        | 4                   | 2  | 3  | 3  | 2  | 0  |    |    | -0.065       | 0.854 |
|                           | L3        | 11                        | 5                   | 4  | 2  | 2  | 2  | 1  |    |    | -0.033       | 0.653 |
| $F_2$<br>$\chi^2 P=0.938$ | L         | 33                        | 5                   | 10 | 6  | 7  | 7  | 3  |    |    | -0.011       | 0.418 |
|                           | L1        | 12                        | 7                   | 3  | 1  | 2  | 3  | 1  | 1  | 1  | -0.034       | 0.779 |
|                           | L2        | 10                        | 5                   | 0  | 1  | 2  | 1  | 5  | 1  | 0  | 0.040        | 0.175 |
| $F_3$<br>$\chi^2 P=0.082$ | L3        | 11                        | 6                   | 4  | 2  | 1  | 2  | 1  | 1  | 0  | -0.019       | 0.565 |
|                           | L         | 33                        | 7                   | 7  | 4  | 5  | 6  | 7  | 3  | 1  | <b>0.001</b> | 0.396 |
|                           | L1        | 12                        | 4                   | 6  | 4  | 1  | 1  |    |    |    | 0.062        | 0.091 |
| $F_4$<br>$\chi^2 P=0.654$ | L2        | 10                        | 2                   | 2  | 2  | 0  | 6  |    |    |    | 0.115        | 0.047 |
|                           | L3        | 11                        | 3                   | 2  | 2  | 7  | 0  |    |    |    | 0.153        | 0.014 |
|                           | L         | 33                        | 4                   | 10 | 8  | 8  | 7  |    |    |    | -0.018       | 0.883 |
| $F_5$<br>$\chi^2 P=0.858$ | L1        | 12                        | 3                   | 4  | 2  | 6  | 3  |    |    |    | 0            | 0.407 |
|                           | L2        | 12                        | 3                   | 6  | 5  | 1  |    |    |    |    | 0.042        | 0.174 |
|                           | L3        | 12                        | 3                   | 4  | 5  | 3  |    |    |    |    | -0.042       | 0.624 |
| $F_6$<br>$\chi^2 P=0.580$ | L         | 36                        | 3                   | 14 | 12 | 10 |    |    |    |    | -0.012       | 0.647 |
|                           | L1        | 12                        | 4                   | 2  | 3  | 4  | 3  |    |    |    | -0.049       | 0.794 |
|                           | L2        | 12                        | 3                   | 7  | 4  | 0  | 1  |    |    |    | 0.069        | 0.121 |
| $F_7$<br>$\chi^2 P=0.858$ | L3        | 12                        | 4                   | 3  | 3  | 4  | 2  |    |    |    | -0.049       | 0.784 |
|                           | L         | 36                        | 4                   | 12 | 10 | 8  | 6  |    |    |    | -0.005       | 0.536 |
|                           | L1        | 12                        | 3                   | 3  | 5  | 4  |    |    |    |    | -0.042       | 0.624 |
| $F_8$<br>$\chi^2 P=0.580$ | L2        | 12                        | 3                   | 7  | 1  | 4  |    |    |    |    | 0.069        | 0.053 |
|                           | L3        | 12                        | 3                   | 6  | 5  | 1  |    |    |    |    | 0.042        | 0.174 |
|                           | L         | 36                        | 3                   | 16 | 11 | 9  |    |    |    |    | <b>0.001</b> | 0.349 |

(待续 to be continued)

(续表 3 Tab. 3 continued)

| 母本 female                                | 分区 region | 测序子代数 genotyped offspring | 父本数 number of sires | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | B     | P     |
|--|-----------|---------------------------|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|-------|-------|
| F <sub>7</sub><br>χ <sup>2</sup> P=0.939 | L1        | 12                        | 2                   | 9  | 3  |    |    |    |    |    | 0.083 | 0.036 |
|  | L2        | 11                        | 2                   | 9  | 2  |    |    |    |    |    | 0.306 | 0.005 |
|  | L3        | 12                        | 2                   | 11 | 1  |    |    |    |    |    | 0.157 | 0.006 |
| F <sub>7</sub>                           | L         | 35                        | 2                   | 29 | 6  |    |    |    |    |    | 0.202 | 0.000 |
| F <sub>8</sub><br>χ <sup>2</sup> P=0.994 | L1        | 11                        | 3                   | 6  | 3  | 2  |    |    |    |    | 0.011 | 0.371 |
|  | L2        | 12                        | 3                   | 8  | 3  | 1  |    |    |    |    | 0.176 | 0.005 |
|  | L3        | 11                        | 3                   | 8  | 2  | 1  |    |    |    |    | 0.125 | 0.030 |
| F <sub>8</sub>                           | L         | 34                        | 3                   | 22 | 8  | 4  |    |    |    |    | 0.135 | 0.000 |
| F <sub>9</sub>                           | L         | 15                        | 1                   | 15 |    |    |    |    |    |    | NA    | NA    |

注: L1, 靠近泄殖孔端的卵巢分区; L2, 中部卵巢分区; L3, 远离泄殖孔端卵巢分区; L 代表左右卵巢. M1-M7 表示父本; χ<sup>2</sup>P 表示独立性检验差异性.

Note: L1 represents the proximal part from the cloacal orifice of ovary; L2 represents the middle part of ovary; L3 represents the distal part of ovary; L represent the left of the ovary; M1-M7 represent the assumed sires per female; χ<sup>2</sup>P represents the significance of Chi square independent inspection.

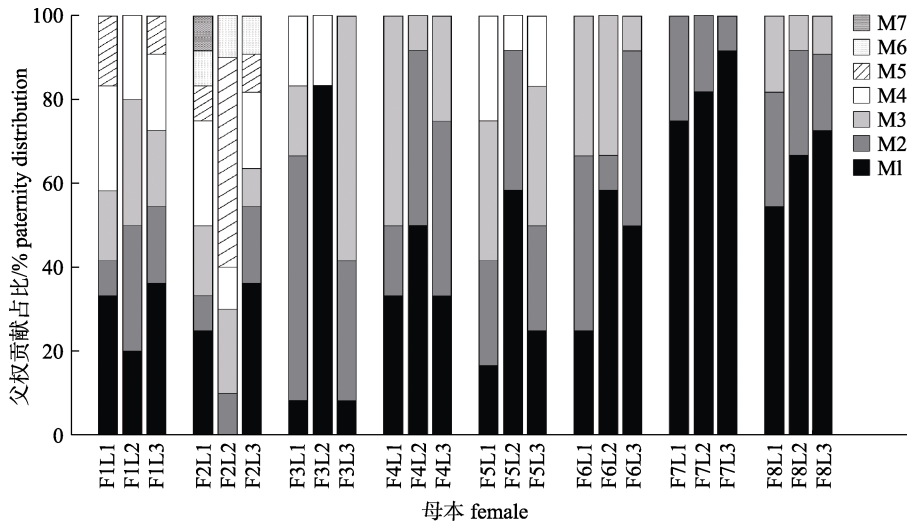


图 3 许氏平鲷雌鱼卵巢各分区子代的父权贡献率分布

L1 代表靠近泄殖孔端的左卵巢分区; L2 代表中部左卵巢分区; L3 代表远离泄殖孔端的左卵巢分区; F1-F7 表示母本; M1-M7 表示父本.

Fig. 3 The proportion of paternity in different ovarian regions in *Sebastes schlegelii*

L1 represents the proximal part from the cloacal orifice of the left ovary; L2 represents the middle part of the left ovary; L3 represents the distal part of the left ovary; F1-F7 represents the female; M1-M7 represents the assumed sires per female.

此外, 解剖过程中发现有一尾雌鱼(F<sub>9</sub>)远离泄殖孔一端的卵巢中存在大量未受精的卵细胞, 对其卵巢前中后部共 15 个子代进行父权分析, 结果表明均源于 1 个父本。通过从左、右卵巢的前、中、后区各重复取样 6 次计算其平均受精率, 结果表明雌鱼(F<sub>9</sub>)左卵巢前、中、后区平均受精率分别为 (96.03±1.11)%、(92.23±3.32)%、(59.37±9.26)%, 右卵巢前、中、后区受精率分别为

(94.94±1.13)%、(59.42±5.47)%、(27.78±3.10)%。

### 3 讨论

#### 3.1 许氏平鲷多重父权

雌性与雄性多次交配除获得遗传多样性的增加、亲本的遗传互补等间接利益外, 也可获得受精保证、营养物质的获取及亲代抚育等直接利益<sup>[2,8]</sup>。在平鲷属鱼类繁殖过程中, 性成熟雄鱼和



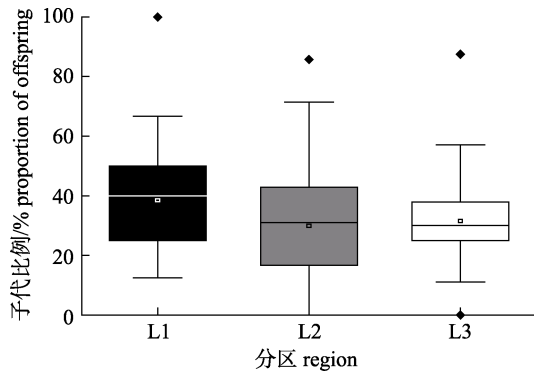


图 4 父本在雌鱼卵巢不同分区子代比例  
L1 代表左卵巢靠近泄殖孔端的分区; L2 代表左卵巢中部分区; L3 代表左卵巢远离泄殖孔端的分区。  
Fig. 4 The ratio of paternal offspring in the different regions of ovary in *Sebastes schlegelii*  
L1 represents the proximal part from the cloacal orifice of the left ovary; L2 represents the middle part of the left ovary; L3 represents the distal part of the left ovary.

雌鱼以特殊的垂吊方式进行交配, 交配完成之后雄性即离开, 雌性并未获得雄性的亲代抚育及营养物质供给等直接利益<sup>[37]</sup>, 此外研究发现在美洲平鲷(*S. melanops*)交配过程中存在精子泄漏现

象<sup>[38]</sup>, 因此, 受精保证可能是平鲷属雌性与多个雄性交配获得的直接利益。本研究结果显示在选取的 9 个许氏平鲷子代群中, 8 个子代群(88.89%)检测到多重父权现象, 与以往对养殖许氏平鲷群体多重父权的研究类似(91.67%和 88.89%)<sup>[27-28]</sup>, 表明许氏平鲷多重父权出现频率极高。分析认为由于许氏平鲷雌性繁殖力高达 20 万粒, 一个卵细胞周围往往储存有多个精子<sup>[20]</sup>, 因此其对精子需求量高, 为保证足够的精子供应或许是许氏平鲷雌性与雄性多次交配的主要原因。

除精子储存特性外, 雌雄鱼相遇频率对多重父权水平也具有一定影响<sup>[27]</sup>。本研究中许氏平鲷平均父权数(3.56±1.64)高于以往对许氏平鲷养殖群体和平鲷属其他鱼种的平均父权数的报道(表 4)<sup>[5-6,27-28,39-40]</sup>。这可能是因为本研究采集的为饲养密度较高的养殖群体, 群体密度高于此前研究报道的其他鱼种野生群体和许氏平鲷养殖群体, 雌雄鱼相遇以及交配频率较高, 可能导致本研究中许氏平鲷平均父权数较高。

表 4 平鲷属鱼类多重父权频率比较

Tab. 4 The comparison of multiple paternity frequency in *Sebastes* fish

| 种类<br>species                      | 微卫星位点数<br>number of marker<br>loci | 亲本数量<br>number of parents<br>assayed | 多重父权频率/%<br>frequency of mul-<br>tiple paternity | 平均父权数<br>average number of<br>sires | 群体类型<br>population type     | 参考文献<br>reference |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 许氏平鲷<br><i>Sebastes schlegelii</i> | 6                                  | 9                                    | 88.89  | 3.56                                | 养殖群体<br>cultured population | 本研究<br>this study |
| 许氏平鲷<br><i>Sebastes schlegelii</i> | 6                                  | 12                                   | 91.67  | 3.08                                | 养殖群体<br>cultured population | [27]              |
| 许氏平鲷<br><i>Sebastes schlegelii</i> | 6                                  | 9                                    | 88.89  | 2.00                                | 养殖群体<br>cultured population | [28]              |
| 革平鲷<br><i>Sebastes alutus</i>      | 5                                  | 66                                   | 71.20  | 1.90                                | 野生群体<br>wild population     | [5]               |
| 墨绿平鲷<br><i>Sebastes atrovirens</i> | 7                                  | 8                                    | 87.50  | 2.10                                | 野生群体<br>wild population     | [6]               |
| 美洲平鲷<br><i>Sebastes melanops</i>   | 3                                  | 17                                   | 65.00  | 2.00                                | 野生群体<br>wild population     | [39]              |
| 无备平鲷<br><i>Sebastes inermis</i>    | 4                                  | 5                                    | 20.00  | 1.20                                | 野生群体<br>wild population     | [40]              |

### 3.2 许氏平鲷卵巢内的父权分布

国内外关于水生动物子代父权分布的相关研究极少, 已有的结果存在较大差异。Naud 等<sup>[15]</sup>研究发现雌性枪乌贼通过控制卵链(雌性个体从

输卵管中挤出的包含数百个卵子的胶状线)的排出, 使不同部位的卵子与来自不同雄性的精子接触, 进而导致部分卵链上的父权分布不均匀。Barreto 等<sup>[30]</sup>对海蜘蛛(*Ammothea hilgendorfi*)的研

究表明雄性携卵肢上来自不同雌性的子代分簇排列。在海龙属鱼类如宽吻海龙(*Syngnathus typhle*)、舒氏海龙中,研究发现因雌性将未受精卵转移到雄性腹侧表面的不同位置进行受精,导致了雄性海龙育儿袋内不同区域的母权分布不一致<sup>[16-17]</sup>。综上,雌性可通过控制排卵时间从而影响卵子与精子的接触进而导致父权不均匀的分布。而 Walker 等<sup>[18]</sup>研究发现娥螺卵链上不同区域的父权无显著差异; Xue 等<sup>[12]</sup>研究发现雌性脉红螺不同卵囊的父权分布相似; 雌性塔斯马尼亚四盘耳乌贼(*Euprymna tasmanica*)分批产下的后代,其父本也无显著差异<sup>[41]</sup>。分析认为,受精前储精器官中精子的充分混合是父权随机分布的主要原因。本研究中,单因素方差分析表明,在 8 个具多重父权的母本及子代中,父本在雌鱼卵巢不同分区的子代比例无显著差异。通过卡方均匀分布检验进一步分析每个个体卵巢中的父权分布情况,发现也均无显著偏倚,结果表明许氏平鲉卵巢内父权随机分布。此前, Mori 等<sup>[42]</sup>通过卵巢组织切片并未发现许氏平鲉具特殊的精子储存结构,因此其交配后来自不同雄性个体的精液可能在雌鱼卵巢内发生了充分混合,导致父权在卵巢不同区域随机分布。

配偶选择行为可能会影响雌性个体从某一雄性获得精子的数量,精子数量和精子活性则是精子竞争成功的主要预测因素,贡献更多和更优质精子的雄性往往会获得更高的父权份额<sup>[43]</sup>。本研究中,对于 8 个具多重父权的母本及子代群而言,虽然父本在卵巢各分区随机分布,但在其中 4 个母本的后代群(50%,  $B>0$ )中,各父本贡献率存在不同程度的偏倚(表 3),此可能与交配前的性选择与交配后长时间的精子储存有关。平鲉属鱼类交配前展现出了细致复杂的求偶行为<sup>[37]</sup>,交配时间的长短、精子转运到雌性体内的数量、交配的先后顺序等会对父权贡献率产生影响<sup>[2]</sup>。此外,雌性长期的精子储存为其交配后的性选择提供了可能<sup>[27]</sup>。因此,不同于部分昆虫种类如地中海果蝇,精子层化分布于雌性精子储存器官中,雌性昆虫可选择性地利用不同雄性的精子,从而促使后代

父权贡献率存在不同程度的偏倚<sup>[2,13]</sup>。许氏平鲉交配后来自不同雄性的精子在卵巢内充分混合,雌性可能通过交配前的性选择及交配后长时间的精子储存,间接影响来自不同雄性个体的精子数量与精子活性,进而导致子代的父权贡献率发生不同程度的偏倚。

此外,本研究在取样过程中发现其中一尾雌鱼远离泄殖孔一端的卵巢内绝大多数的卵细胞并未受精(图 1)。因其胚胎发育程度较低,部分基因扩增结果较差未纳入后续分析,本研究基于 6 个微卫星标记对其卵巢前中后区的 15 个子代进行父本分析,结果表明其源于 1 个父本。推测出现该现象的原因有二:一为雌性仅与 1 个雄性交配,因长期精子储存,精子活性下降,雌性并未获得足够的精子供应;二为在交配过程中,雌性与雄性交配过程中被其他雄性打断,导致其并未获得足够的精液供应。也有研究发现,网箱养殖许氏平鲉雌性个体存在卵子未受精的现象<sup>[27]</sup>。这可能是因为在高密度养殖环境下,许氏平鲉雌性交配过程中容易受到其他雄性的干扰,导致交配失败所致。

综上所述,本研究通过微卫星亲权鉴定技术分析了许氏平鲉多重父权在卵巢内的分布模式,结果表明许氏平鲉父权在卵巢内随机分布,研究验证了精子在雌鱼体内并不呈分层分布状态,其原因可能与许氏平鲉提前交配,及长时间精子储存的繁殖习性相关。结合已有报道<sup>[20,42]</sup>,本研究认为许氏平鲉交配时,雌鱼卵巢尚未发育成熟,来自不同雄性的精子在细小的卵巢内得以充分混合后,精子经产卵板进入卵细胞周围并储存于透明带中,待卵细胞成熟后精卵结合形成受精卵,受精卵经约 50 d 发育形成仔鱼随后被产出体外(图 5)。本研究进一步探究了交配后雌性许氏平鲉卵巢内的精子分布特征,为丰富许氏平鲉繁殖生物学研究内容提供了理论基础。但本研究仅仅关注了许氏平鲉雌鱼交配后卵巢内的父权分布情况,研究缺乏交配时的交配顺序、交配时长、交配间隔等行为信息,关于交配前雌鱼性选择及交配顺序等对子代父权分布的影响仍需进一步研究。



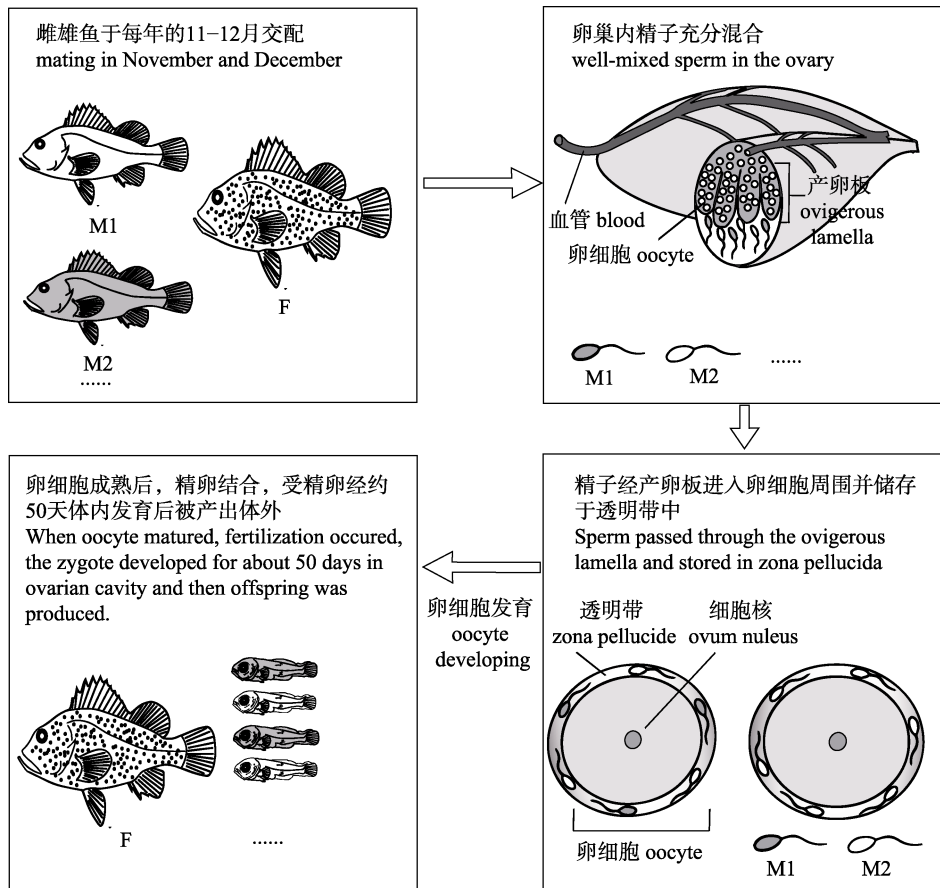


图 5 许氏平鲈繁殖过程示意图(改编自 He 等<sup>[20]</sup>和 Koya 等<sup>[44]</sup>)

Fig. 5 Diagram of reproductive process of *Sebastes schlegelii* (adapted from He, et al<sup>[20]</sup> and Koya, et al<sup>[44]</sup>)

### 参考文献:

- [1] Leslie J F, Vrijenhoek R C. Genetic analysis of natural populations of *Poeciliopsis monacha*: Allozyme inheritance and pattern of mating[J]. Journal of Heredity, 1977, 68(5): 301-306.
- [2] Zhang X M, Zhang D X, Wang L. Reproductive strategies of multiple mating and multiple paternity of aquatic animals[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(11): 22-31. [张秀梅, 张东雪, 王亮. 水生动物多次交配繁殖策略与多重父权研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(11): 22-31.]
- [3] Zeh J A, Zeh D W. The evolution of polyandry II: Post-copulatory defenses against genetic incompatibility[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 1997, 264(1378): 69-75.
- [4] Hunter F M, Petrie M, Otronen M, et al. Why do females copulate repeatedly with one male?[J]. Trends in Ecology & Evolution, 1993, 8(1): 21-26.
- [5] Van Doornik D M, Parker S J, Millard S R, et al. Multiple paternity is prevalent in Pacific ocean perch (*Sebastes alutus*) off the Oregon coast, and is correlated with female size and age[J]. Environmental Biology of Fishes, 2008, 83(3): 269-275.
- [6] Sogard S M, Gilbert-Horvath E, Anderson E C, et al. Multiple paternity in viviparous kelp rockfish, *Sebastes atrovirens*[J]. Environmental Biology of Fishes, 2008, 81(1): 7-13.
- [7] Hyde J R, Kimbrell C, Robertson L, et al. Multiple paternity and maintenance of genetic diversity in the live-bearing rockfishes *Sebastes* spp.[J]. Marine Ecology Progress Series, 2008, 357: 245-253.
- [8] Coleman S W, Jones A G. Patterns of multiple paternity and maternity in fishes[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2011, 103(4): 735-760.
- [9] Xiao Q Z, Liu Q, Li Q Q, et al. Development and application of multiplex PCR panels of microsatellites in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(2): 325-335. [肖起珍, 刘青, 李清清, 等. 中华绒螯蟹微卫星多重 PCR 体系的建立及其亲子鉴定应

- 用[J]. 中国水产科学, 2018, 25(2): 325-335.]
- [10] Yu H, Sun X Q, Yu R H, et al. Mechanism of postcopulatory sexual selection in *Rapana venosa*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(6): 911-916. [于红, 孙晓琪, 于瑞海, 等. 脉红螺交配后的性选择机制[J]. 水产学报, 2016, 40(6): 911-916.]
- [11] Chen R Y, Wang G X, Liu H J, et al. Difference in parental contribution to reproduction in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 698-705. [陈睿毅, 王桂兴, 刘海金, 等. 牙鲆亲本对子代贡献率的实验研究[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 698-705.]
- [12] Xue D X, Zhang T, Liu J X. Microsatellite evidence for high frequency of multiple paternity in the marine gastropod *Rapana venosa*[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86508.
- [13] Scolari F, Yuval B, Gomulski L M, et al. Polyandry in the medfly-shifts in paternity mediated by sperm stratification and mixing[J]. BMC Genetics, 2014, 15(Suppl 2): S10.
- [14] Hellriegel B, Bernasconi G. Female-mediated differential sperm storage in a fly with complex spermathecae, *Scatophaga stercoraria*[J]. Animal Behaviour, 2000, 59(2): 311-317.
- [15] Naud M J, Sauer W H H, McKeown N J, et al. Multiple mating, paternity and complex fertilisation patterns in the chokka squid *Loligo reynaudii*[J]. PLoS ONE, 2016, 11(2): e0146995.
- [16] Jones A G, Avise J C. Mating systems and sexual selection in male-pregnant pipefishes and seahorses: Insights from microsatellite-based studies of maternity[J]. Journal of Heredity, 2001, 92(2): 150-158.
- [17] Dong J Y, Huang Y X, Chen Z, et al. Embryonic development and microsatellite-based parentage assignment of seaweed pipefish *Syngnathus schlegelii*[J]. Hydrobiologia, 2020, 847(3): 913-923.
- [18] Walker D, Power A J, Sweeney-Reeves M, et al. Multiple paternity and female sperm usage along egg-case strings of the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca; Melongeniidae)[J]. Marine Biology, 2007, 151(1): 53-61.
- [19] Jin X B. Chinese Animal Genus Bonefish, Scorpaeniformes[M]. Beijing: Science Press, 2006: 138-142. [金鑫波. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲷形目[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 138-142.]
- [20] He Y, Chang Y, Bao L S, et al. A chromosome-level genome of black rockfish, *Sebastes schlegelii*, provides insights into the evolution of live birth[J]. Molecular Ecology Resources, 2019, 19(5): 1309-1321.
- [21] Kusakari M. Mariculture of kurosoi, *Sebastes schlegelii*[J]. Environmental Biology of Fishes, 1991, 30(1-2): 245-251.
- [22] Lü L K, Zhang S M, Li J F, et al. Effects of photoperiod on morphology, sex hormone levels and gene expression of gonadal differentiation of black rockfish (*Sebastes schlegelii*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(2): 319-329. [吕里康, 张思敏, 李吉方, 等. 光周期对许氏平鲷性腺分化过程中形态学、性激素水平及相关基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 319-329.]
- [23] Shi D, Wen H S, Yang Y P. The annual change of ovarian development in female *Sebastes schlegelii*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2011, 41(9): 25-30. [史丹, 温海深, 杨艳平. 许氏平鲷卵巢发育的周年变化研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(9): 25-30.]
- [24] Liu Q H, Wang X Y, Xiao Y S, et al. Sequencing of the black rockfish chromosomal genome provides insight into sperm storage in the female ovary[J]. DNA Research, 2019, 26(6): 453-464.
- [25] Mu W J, Wen H S, Li J F, et al. Cloning and expression analysis of Foxl2 during the reproductive cycle in Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(6): 1419-1430.
- [26] Wang X J, Zhang S M, Li J F, et al. Studies on histology and gene expression pattern of primitive gonadal differentiation and sex hormone level of black rockfish *Sebastes schlegelii*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(S2): 8-20. [王孝杰, 张思敏, 李吉方, 等. 许氏平鲷早期性腺分化组织学与性激素水平、性腺分化相关基因表达特征[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(S2): 8-20.]
- [27] Gao T X, Ding K, Song N, et al. Comparative analysis of multiple paternity in different populations of viviparous black rockfish, *Sebastes schlegelii*, a fish with long-term female sperm storage[J]. Marine Biodiversity, 2018, 48(4): 2017-2024.
- [28] Yoshida K. Pedigree tracing of a hatchery-reared stock used for aquaculture and stock enhancement based on DNA markers[J]. Fish Genetics and Breeding Science, 2001, 30: 27-35.
- [29] Ng W C, Sadovy Y, Leung F C C. Mating system of the rockfish, *Sebastes marmoratus* as revealed by DNA fingerprinting[J]. Ichthyological Research, 2003, 50(4): 339-348.
- [30] Barreto F S, Avise J C. Polygynandry and sexual size dimorphism in the sea spider *Ammonothea hilgendorfi* (Pycnogonida: Ammonotheidae), a marine arthropod with brood-carrying males[J]. Molecular Ecology, 2008, 17(18): 4164-4175.
- [31] An H S, Park J Y, Kim M J, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for the heavily exploited rock-

- fish *Sebastes schlegeli*, and cross-species amplification in four related *Sebastes* spp.[J]. Conservation Genetics, 2009, 10(6): 1969-1972.
- [32] Jones O R, Wang J L. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 551-555.
- [33] Nonacs P. Measuring and using skew in the study of social behavior and evolution[J]. The American Naturalist, 2000, 156(6): 577-589.
- [34] Zhao J, Feng Q C, Wen H S. The developmental morphology of ovoviviparous *Sebastes schlegeli* in vitro culture[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1195-1202. [赵吉, 冯启超, 温海深. 卵胎生许氏平鲈胚胎离体培养及发育形态学[J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1195-1202.]
- [35] Boehlert G W, Yamada J, SpringerLink O S. Rockfishes of the Genus *Sebastes*: Their Reproduction and Early Life History[M]. Dordrecht: Springer, 1991: 103-111.
- [36] He Y F, Zhu Y J, Wu X B, et al. Parentage analysis of *Coreius guichenoti* using microsatellites[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(6): 1216-1223. [何勇凤, 朱永久, 吴兴兵, 等. 基于微卫星标记的圆口铜鱼亲子鉴定技术[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1216-1223.]
- [37] Helvey M. First observations of courtship behavior in rockfish, genus *Sebastes*[J]. Copeia, 1982, 1982(4): 763-770.
- [38] Shinomiya A, Ezaki O. Mating habits of the rockfish *Sebastes inermis*[J]. Environmental Biology of Fishes, 1991, 30(1-2): 15-22.
- [39] Karageorge K W, Wilson R R Jr. An integrative mating system assessment of a nonmodel, economically important Pacific rockfish (*Sebastes melanops*) reveals nonterritorial polygamy and conservation implications for a large species flock[J]. Ecology and Evolution, 2017, 7(24): 11277-11291.
- [40] Blanco Gonzalez E, Murakami T, Teshima Y, et al. Paternity testing of wild black rockfish *Sebastes inermis* (brownish type) from the Seto Inland Sea of Japan[J]. Ichthyological Research, 2009, 56(1): 87-91.
- [41] Squires Z E, Wong B B M, Norman M D, et al. Multiple paternity but no evidence of biased sperm use in female dumpling squid *Euprymna tasmanica*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2014, 511: 93-103.
- [42] Mori H, Nakagawa M, Soyano K, et al. Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegeli* in captivity[J]. Fisheries Science, 2003, 69(5): 910-923.
- [43] Boschetto C, Gasparini C, Pilastro A. Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*)[J]. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2011, 65(4): 813-821.
- [44] Koya Y, Muñoz M. Comparative study on ovarian structures in scorpaenids: Possible evolutionary process of reproductive mode[J]. Ichthyological Research, 2007, 54(3): 221-230.

## Microsatellite-based parentage analysis of offspring conducted in different regions of the black rockfish (*Sebastes schlegelii*) ovary

LUO Zhiqing<sup>1</sup>, DONG Jianyu<sup>1</sup>, ZHANG Zonghang<sup>1</sup>, XU Xiuwen<sup>1</sup>, ZHANG Xiumei<sup>2,3</sup>

1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China

**Abstract:** The black rockfish (*Sebastes schlegelii*) is an important economic fish species widely distributed across the coastal areas of northern China. It has been widely studied due to its special viviparous reproductive strategy and long-term sperm storage characteristics. Although there are some previous reports about multiple paternity in *S. schlegelii*, the spatial distribution pattern of paternity in the ovary has not been studied. In this study, the multiple paternity in different regions of the ovary was investigated by applying six polymorphic microsatellite markers to genotype 9 cultured pregnant females and 291 of their offspring in different regions (the proximal part from the cloacal orifice, the middle part, and the distal part) of the ovary in *S. schlegelii*. The results showed that: (1) Multiple paternity was detected in 8 of 9 (88.89%) cultured female fish, which was similar to the findings of reports of the previous two scholars whose work focused on cultured and wild black rockfish. However, the average number of copulations was 3.56 times, which was higher than that reported in previous studies. The reason for this phenomenon might be the higher group density (7–8 fish/m<sup>3</sup>) than in previous studies. Furthermore, four broods were significantly skewed from equal paternal contributions (50%,  $B>0$ ); (2) the results of one-way ANOVA showed that the proportions of paternal offspring did not significantly differ in the different regions of the ovary in females; and (3) the chi-square uniform distribution test results showed that the paternal offspring in each family had no significant bias in different ovary regions, indicating that multiple paternity in *S. schlegelii* is randomly distributed in the ovary due to a degree of sperm mixing in the female's ovaries after mating to some extent. Considering that the ovaries of female fish are not yet mature in *S. schlegelii* during the mating period, the sperm from different males may be completely mixed in the immature ovary and then stored in it. The differences in males' sperm number and sperm activity may be the important reasons for the bias of paternity contribution rate. These results may provide a scientific basis for the enrichment of reproductive biology research on *S. schlegelii*.

**Key words:** multiple paternity; multiple mating; distribution of offspring; microsatellite; *Sebastes*

**Corresponding author:** ZHANG Xiumei. E-mail: xiumei1227@163.com