

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*

王伟 尤 锋^{†1)} 高天翔^{††} 张培军[†]

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

^{††}(中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

提要 采用微卫星遗传标记技术对山东近海牙鲆自然群体和养殖群体的遗传多样性进行了研究。实验所用牙鲆于 2003 年 5 月分别采自山东近海和青岛胶南养鱼场, 各 20 尾, 取全血或肌肉组织, 以酚-仿抽提方法提取基因组 DNA, 利用筛选获得的 10 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 反应产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、EB 显色, 用 ImageMaster1D Elite (Version 3.01) 软件分析电泳结果, 并计算了相应的遗传学参数。结果表明, 在自然和养殖群体中, 10 个基因座位的等位基因平均数 (a) 分别为 6.7 和 6.1, 每个基因座位有效等位基因数 (a_e) 分别为 1.8—6.8 和 2.5—6.7, 群体平均杂合度 (H) 分别为 0.8120 和 0.7310; 两个群体间的遗传相似性系数、遗传距离和基因分化系数为 0.8558、0.1557 和 0.0558; 自然群体内每个座位上的多态信息含量 (PIC) 为 0.59—0.84、个体识别率 (DP) 为 0.54—0.86、非父排除率 (PPE) 为 0.41—0.72, 其累积个体识别率和非父排除率均达到 0.9999, 表明所选座位属中高识别力的遗传标记, 可以将它们应用于今后牙鲆雌核发育群体的遗传变异分析以及进一步的遗传育种的研究中。

关键词 牙鲆, 自然和养殖群体, 微卫星, 遗传变异

中图分类号 Q953

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 由于其经济价值高, 自然资源的逐步衰竭, 其养殖业被迅速地开展起来, 近十年来逐渐成为我国北方乃至南方海域的重要增养殖鱼类品种。为了开展其保护生物学研究和促进养殖业的健康发展, 有必要对牙鲆的遗传背景进行深入的研究, 尽快掌握群体及其种质资源状况从而制定和实施更科学合理的渔业管理政策, 奠定进一步开展遗传育种研究的标记基础。目前国内对于牙鲆群体遗传学研究的报道只见于自然和养殖群体生化遗传结构和 RAPD 遗传分析的研究 (尤锋等, 2001; You *et al.*, 2002; 黎中宝等, 2003)。但是, 同工酶和 RAPD 揭示的遗传信息相对较少, 很难满足更进一步的研究的需要。DNA 分子标记技术的发展为生物群体遗传多样性

的研究提供了新的手段, 微卫星 DNA (Microsatellite DNA) 标记作为其中的一种, 具有丰富的多态性, 能够显示出极高的个体特异性, 重复性也好, 可以揭示更多的遗传变异信息。

微卫星 DNA 由于其座位数目巨大并随机分布于基因组中, 具有丰富的多态性和简单的孟德尔遗传方式, 在动物的种群遗传分析、亲本鉴定、基因组作图、系统发育和遗传育种中具有优于其他标记的明显优势 (O'Connell *et al.*, 1997), 近年来已成为分子生态学的研究热点之一。在海洋生物中现已开发出大量的包括大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鳕鱼 (*Gadus morrhua*)、罗非鱼 (*Tilapia mossambica*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.)、鲶鱼 (*Silurus asotus*)、大菱

* 国家“863”项目资助, 2002AA629160 号; 国家自然科学基金项目资助, 30271036 号。王伟, 硕士生, E-mail: david-wung@hotmail.com

1) 通讯作者, 尤 锋, 博士, 副研究员, E-mail: youfeng@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-08-12, 收修改稿日期: 2004-05-28

鲆(*Scophthalmus maximus*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)等重要经济水生生物的微卫星序列并公开发布在 GenBank 上,研究者可以根据自己的要求选取所需的序列进行研究,大大节省了人力和物力。对于牙鲆的相关研究,日本学者 Sekino 等(2000)和 Coimbra 等(2003)分离了大量的牙鲆微卫星 DNA,并在种群遗传分析和遗传图谱的构建上进行了部分的研究工作。在国内,包括牙鲆在内的海水鱼类中尚未见到微卫星研究的相关报道。作者从 Sekino 等(2000)分离的 16 对引物中选取 9 对引物,并参照 GenBank 上牙鲆的相关序列设计了一对引物,共 10 对引物,对山东近海牙鲆自然和养殖群体的遗传变异进行了研究,以期为今后雌核发育牙鲆的遗传变异分析寻找更丰富的遗传标记。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

实验所用牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)均为活样本,自然群体样本于 2003 年 5 月捕自青岛近海,共 20 尾,均为成鱼,尾静脉采血,1:1 的阿氏抗凝剂抗凝,保存于 4℃ 冰箱中备用;养殖群体样本于 2003 年 5 月取自山东青岛胶南养鱼场,共 20 尾,均为当年的同一批苗种,活体解剖,取其肌肉组织分装到样品袋中,保存于 -20℃ 冰箱中备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 分别从全血和肌肉组织中提取,

取约 100mg 的肌肉组织或者约 50 μ l 的全血,加入 500 μ l 组织匀浆缓冲液(10mmol/L Tris-Hcl, pH = 8.0; 50mmol/L EDTA, pH = 8.0),混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200 μ g/ml 的蛋白酶 K,于 55℃ 烘箱中消化至澄清,等体积的饱和酚、氯仿:异戊醇(24:1)抽提,二倍体积预冷的无水乙醇沉淀,双蒸水(ddH₂O)溶解,Beckman DU 650 型紫外分光光度计定量, -20℃ 保存备用。

1.3 PCR 反应及电泳

从 Sekino 等(2000)分离的 16 对引物中选取 9 对引物,并参照 GenBank 上牙鲆的相关序列,用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计了一对引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,这 10 对引物的序列及退火温度见表 1。PCR 反应总体积为 25 μ l,内含 50ng 的模板 DNA,0.4 μ mol/L 的引物,100 μ mol/L 的 dNTPs,1.0mmol/L 的 Mg²⁺,1 \times PCR 反应缓冲液,1U 的 TaqDNA 聚合酶(Promega)。反应在 Eppendorf Mastercycler PCR 扩增仪上进行。PCR 反应为 35 个循环,每个循环包括:94℃ 变性 1min,退火 30s,72℃ 延伸 45s;首次循环前预变性 5min,最后一次循环结束后 72℃ 再延伸 5min。PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压为 5V/cm。电泳完毕后用溴化乙锭(浓度为 0.5 μ g/ml)染色,在 ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech)上紫外成像,用 ImageMaster 1D Elite (Version 3.01)软件对电泳谱带进行分析。

表 1 实验所用 10 个微卫星标记的核心序列、退火温度及其引物序列

Tab.1 Core repeats, annealing temperatures and primer sequences of the 10 microsatellite DNA loci used in the study

基因座位	核心重复序列	退火温度(℃)	引物序列(5'-3')
Po1	(TG) ₃ TT(TG) ₈	55	F-GCCTTTTTCAGCCATTAACAGAGC R-CTGAGGCCAGACATGACATTACCTT
Po13	(TG) ₃ GA(CA) ₁₃	58	F-CGGCCTAAACCTGGACATCCTCTCTA R-CGGGACAACGGAGTTTGACTGAC
Po33	(TG) ₅ T ₂ (TG) ₁₀	55	F-GTTGGTTTAACTGATTCATCTGCAG R-TTACATATCCCACAATGCTTCACTC
Po35	(CA) ₇	54	F-TGCTTCTAGTGTTCCTGCTGGA R-CCTACAGCACAGATATGACCTTT
Po42	(CA) ₅ (TA) ₁₃ (CA) ₃	55	F-CGAGCGCTGTTTCAACTACGGTCATT R-ATGATGATCTAACCGTCCGGCTCCAT

续表

基因座位	核心重复序列	退火温度(℃)	引物序列(5'—3')
Po48	(CACG) ₄ (CA) ₅	55	F-GCCTCCAGAAACATTTATGGGG R-TGTCTTGCCTCTGGTCCTTCTT
Po56	(AC) ₂₀	55	F-TCGAGCGTAAACAAACCAGCTAACA R-GCTGAAAATCGCTTTAGCTTCCCAT
Po89	(CA) ₇	60	F-ATCAGAAGTCATCCATGCCACTGGCAC R-AGCTACTTATCCACAGGTGTCGACGG
Po91	(CA) ₁₈	55	F-AGGTTTCAAGGTGTTTCATTGCGAGTC R-TAAAGGAAGTGCCTCACTGTGGAGAA
Po-str1	(CA) ₁₀	58	F-GATTGTTCACTACCTGTTCAACCTG R-TCATTAACAGACGGAGCACCC

注: Po-str1 为自行设计的一对引物,其余引物选自 Sekino 等(2000)

1.4 实验数据的统计分析

在遗传变异的数据分析中,作者将电泳谱带中的每一条 DNA 片段作为该座位的一个等位基因来处理,在相同的迁移位置,出现扩增带记录为 1,无扩增带记录为 0,每对引物扩增的等位基因按其迁移率的不同从小到大依次定义为:1、2、3、……、*n*。计算了等位基因平均数(*a*)、每个微卫星座位的有效等位基因数(*a_e*)、多态座位杂合度的观察值(*H_o*)与无偏倚预期值(*H_e*)、Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(*d*)以及群体平均杂合度(*H*)来考察群体内的遗传变异水平;用遗传相似性系数(*I*)、遗传距离(*D*)和基因分化系数(*G_{ST}*)来研究群体间的遗传变异水平;并以自然群体的基因频率和基因型频率为基础计算了每个座位上的多态信息含量(polymorphism information content, *PIC*)、个体识别率(power of discrimination, *DP*)和非父排除率(probability of paternity exclusion, *PPE*),用来评价所选标记在个体识别和亲权鉴定上的应用价值。有关计算公式如下:

$$\text{平均等位基因数: } a = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} x_i;$$

$$\text{有效等位基因数: } a_e = 1 / \sum p_i^2;$$

平均杂合度观测值: *H_o* = 观察到的杂合个体总数/观察到的个体总数;

无偏倚杂合度期望值 (Nei, 1978): *H_e* =

$$N \left(1 - \sum p_i^2 \right) / (N - 1);$$

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数: *d* = (*H_o* -

H_e)/*H_e*;

群体间的遗传相似性系数、遗传距离和基因

$$\text{分化系数 (Nei, 1975): } I = \frac{\sum p_i q_i}{\sqrt{\sum p_i^2 \sum q_i^2}}, D =$$

$$- \ln I, G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T;$$

多态信息含量 (Botstein, 1980): *PIC* = 1 -

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

非父排除率 (Odelberg, 1990): *PPE* =

$$\sum p_i (1 - p_i)^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (p_i p_j)^2 (3p_i + 3p_j - 4),$$

累积非父排除率 (cumulate *PPE*): *C_{PPE}* = 1 - (1 - *PPE*₁)(1 - *PPE*₂)…(1 - *PPE*₁₀), *PPE*₁、*PPE*₂、…、*PPE*₁₀ 分别表示 10 个微卫星基因座各自的非父排除率;

个体识别率 (Fisher, 1951): *DP* = 1 -

$$\sum_{i=1}^m P_i^2, \text{累积个体识别率 (cumulate } DP) \text{ 为: } C_{DP} = 1$$

- (1 - *DP*₁)(1 - *DP*₂)…(1 - *DP*₁₀), *DP*₁、*DP*₂、…、*DP*₁₀ 分别表示 10 个微卫星基因座各自的个体识别率。

以上公式中, *x_i* 代表第 *i* 个座位上的等位基因数, *p_i*、*p_j* 分别表示某一座位第 *i*、*j* 个等位基因的频率, *p_i*、*q_i* 分别表示某一座位在两群体中第 *i* 个等位基因的频率, *P_i* 表示某一座位第 *i* 个等位基因型的频率, *m* 代表某一座位上的等位基因型数, *n* 表示某一座位上的等位基因数, *N* 代表样本数, *H_T* 为群体总平均遗传多样性, *H_S* 为群体内平

均遗传多样性。

2 结果

2.1 微卫星 PCR 结果

本研究采用 10 对微卫星引物对山东近海牙鲆的自然和养殖群体进行了遗传变异分析,它们在所研究的群体中都能稳定重复地扩增出相应的序列(图 1)。随引物的不同可得到 2—9 个等位基因(表 2),每个座位在野生和养殖群体中的等位

基因频率见表 3。

2.2 遗传变异分析

微卫星分析结果表明,牙鲆自然和养殖群体的等位基因平均数分别为 6.7 和 6.1,其中两个群体每个座位的等位基因数、有效等位基因数、多态座位杂合度的观测值、预期值和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数均列于表 2 中;自然群体各个座位上的多态信息含量、个体识别率、非父排除率见表 4。

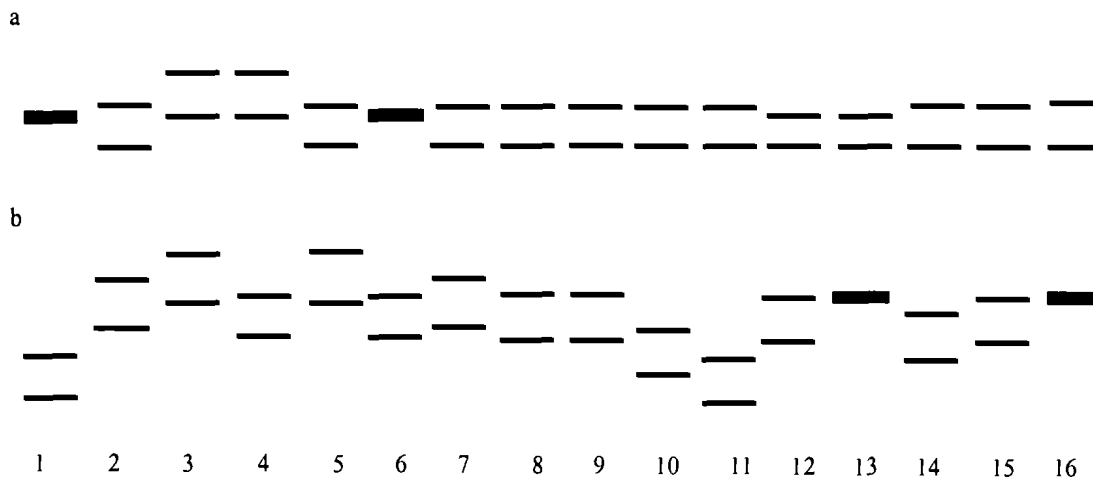


图 1 引物 *Po33*(a)、*Po91*(b)扩增出来的微卫星标记图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of microsatellite markers amplified by *Po33* (a) and *Po91* (b) from *P. olivaceus*

其中 1—8 泳道为自然群体的扩增图谱,9—16 为养殖群体的扩增图谱

表 2 牙鲆自然和养殖群体中 10 个微卫星座位的等位基因数、有效等位基因数、多态座位杂合度的观测值、无偏倚预期值和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数

Tab.2 Number of alleles (A), number of effective alleles (a_e), observed heterozygosity (H_o), unbiased expected heterozygosity (H_e) and d value at the 10 microsatellite loci assessed for the natural and cultured stocks in *P. olivaceus*

基因座位	自然群体				养殖群体			
	$A(a_e)$	H_o	H_e	d	$A(a_e)$	H_o	H_e	d
<i>Po1</i>	8(5.8)	1.0000	0.8711	0.1480	7(5.0)	0.9000	0.8421	0.0688
<i>Po13</i>	7(5.7)	1.0000	0.8526	0.1728	8(6.2)	0.8800	0.8889	-0.0100
<i>Po33</i>	5(2.9)	0.8000	0.6882	0.1624	4(3.8)	0.8500	0.7723	0.1006
<i>Po35</i>	6(4.1)	1.0000	0.7947	0.2583	5(3.7)	0.8500	0.3295	1.5799
<i>Po42</i>	6(5.1)	1.0000	0.8447	0.1838	8(5.1)	0.9500	0.8471	0.1215
<i>Po48</i>	5(2.5)	0.7500	0.6303	0.1899	2(1.8)	0.6500	0.4619	0.4072
<i>Po56</i>	8(6.7)	1.0000	0.8947	0.1176	7(6.3)	1.0000	0.8868	0.1276
<i>Po89</i>	5(4.2)	0.6000	0.8000	-0.2500	8(4.8)	0.9500	0.8316	0.1424
<i>Po91</i>	9(6.3)	0.9000	0.8856	0.0163	9(6.8)	0.9500	0.8987	0.0570
<i>Po-str1</i>	8(5.4)	1.0000	0.8579	0.1656	3(2.1)	1.0000	0.5514	0.8137

注:除了 *Po13* 座位上养殖群体为 18 个个体,其余座位在两群体中均为 20 个个体

表 3 山东近海牙鲆自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的等位基因频率

Tab.3 Allele frequencies of 10 microsatellite loci for natural and cultured stocks in *P. olivaceus*

基因座位	等位基因	等位基因频率		基因座位	等位基因	等位基因频率	
		野生群体	养殖群体			野生群体	养殖群体
Po1	1	0.050	0.175	Po56	3	0.125	0.000
	2	0.075	0.025		4	0.100	0.325
	3	0.125	0.150		5	0.600	0.675
	4	0.250	0.250		1	0.050	0.050
	5	0.050	0.000		2	0.150	0.125
	6	0.075	0.075		3	0.200	0.175
	7	0.125	0.050		4	0.100	0.200
	8	0.250	0.275		5	0.050	0.000
Po13	1	0.000	0.028	6	0.150	0.125	
	2	0.150	0.056	7	0.200	0.175	
	3	0.250	0.139	8	0.100	0.150	
	4	0.075	0.000	Po89	1	0.000	0.125
	5	0.175	0.167		2	0.150	0.175
	6	0.250	0.250		3	0.000	0.050
	7	0.075	0.110		4	0.325	0.100
	8	0.025	0.167		5	0.275	0.375
	9	0.000	0.083		6	0.175	0.075
Po33	1	0.050	1.175		7	0.075	0.050
	2	0.325	0.250		8	0.000	0.050
	3	0.050	0.000		Po91	1	0.050
	4	0.100	0.225	2		0.075	0.075
	5	0.475	0.350	3		0.100	0.150
Po35	1	0.125	0.025	4		0.225	0.200
	2	0.300	0.050	5		0.000	0.100
	3	0.075	0.000	6	0.000	0.075	
	4	0.075	0.100	7	0.225	0.225	
	5	0.350	0.325	8	0.175	0.075	
	6	0.075	0.250	9	0.075	0.000	
Po42	1	0.000	0.025	10	0.050	0.000	
	2	0.400	0.250	11	0.025	0.025	
	3	0.100	0.175	Po-str1	1	0.075	0.000
	4	0.400	0.300		2	0.050	0.000
	5	0.100	0.075		3	0.050	0.000
	6	0.000	0.050		4	0.250	0.475
	7	0.000	0.025		5	0.100	0.000
	8	0.000	0.100		6	0.025	0.000
Po48	1	0.075	0.000		7	0.225	0.500
	2	0.100	0.000		8	0.225	0.025

在平均杂合度预期值的计算上,作者采用了 Nei(1978)发表的适用于小样本资料的无偏倚杂合度的计算公式,使之能更准确的反映群体的遗传变异,同时可计算出牙鲆自然和养殖群体的平均杂合度分别为 0.8120 和 0.7310,平均等位基因数分别为 6.7 和 6.1;根据群体中各座位等位基因频率计算出两群体间的遗传相似度为 0.8558、遗传距离为 0.1557,两群体间的基因分化系数为 0.0558。

表 4 牙鲆自然群体中 10 个微卫星座位上的多态信息含量、个体识别率和非父排除率

Tab.4 The value of polymorphism information content, power of discrimination and probability of paternity exclusion at 10 microsatellite loci in *P. olivaceus* of the natural stock

基因座位	多态信息含量 (PIC)	个体识别率 (DP)	非父排除率 (PPE)
Po1	0.823	0.655	0.684
Po13	0.802	0.635	0.649
Po33	0.648	0.535	0.444
Po35	0.748	0.585	0.574
Po42	0.790	0.605	0.631
Po48	0.590	0.790	0.410
Po56	0.844	0.700	0.717
Po89	0.734	0.835	0.554
Po91	0.832	0.780	0.699
Po-str1	0.808	0.860	0.661
合计		0.9999	0.9999

3 讨论

随着分子生物学研究技术的进步,分子标记的种类越来越多,应用也越来越广。微卫星技术由于其高度的多态性,与其它的标记系统相比能更多的揭示群体的遗传变异水平而日益受到重视。尤锋等(2001)利用同工酶技术检测了山东近海牙鲆自然和养殖群体的平均杂合度分别为 0.0802 和 0.0788,两群体间的遗传距离为 0.0124,用 RAPD 技术得到的牙鲆自然和养殖群体的平均杂合度分别为 0.2739 和 0.2255,群体间的遗传距离为 0.0508,而作者利用微卫星遗传标记的分析结果揭示的平均杂合度则为 0.8120 和 0.7310,两群体间的遗传距离为 0.1557。同样,王强等(1996)用同工酶技术检测了黑龙江水系的不同野鲤群体的等位基因变异,发现野鲤的平均杂合度只有 0.1355;而杜长斌(2000)应用微卫星分析结

果显示野鲤的平均杂合度为 0.64。大熊猫曾被认为是遗传多样性贫乏的动物,中国科学院昆明动物研究所的张亚平等(1995)等克隆了大熊猫的微卫星 DNA,从测序结果设计引物进行扩增,发现具有极高的多态性,其共显性遗传已经用于圈养大熊猫的亲子鉴定,这些结果都显示了微卫星在检测种群异质性方面的优势。

由于微卫星属于特异性扩增,在纯合的座位中理论上只能检测到一个等位基因,在杂合个体中则能检测到两个等位基因。但是在实验过程中作者发现,PCR 产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测、EB 染色成像后在杂合个体中出现了较大片段的非目标带,这是由于在 PCR 反应过程中,杂合子中异源等位基因在退火时错配形成的异源双链造成的,异源双链与同源双链的构像不同导致在非变性胶中的迁移率不同(Ardren *et al.*, 1999),但是这并不影响结果的分析,在计算等位基因时不予以考虑。

遗传标记的应用价值一般可用多态信息含量(PIC)、个体识别力(DP)和非父排除率(PPE)来衡量。一般情况下,多态信息含量能反映出某一个遗传标记所包含的或所能提供的遗传信息的容量,当 $PIC > 0.5$ 时,表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,表明该遗传标记能够较为合理的提供遗传信息,而当 $PIC < 0.25$ 时,表明该遗传标记可提供的遗传信息较差。个体识别率和非父排除率在法医学上常用来作为评价遗传标记在个体识别和亲权鉴定中应用价值的重要参数,一般当 $DP > 0.8$ 、 $PPE > 0.5$ 时,表明所研究的遗传标记具有较高的应用价值(陈腾等, 2002)。在本文中,作者通过与自然群体中无关的 20 个个体的基因型频率及基因频率的计算结果表明,10 个座位上的多态信息含量 $PIC \geq 0.59$,个体识别率为 0.54—0.86,非父排除率为 0.44—0.75,其累积个体识别率和非父排除率均达到 0.9999,属于高识别力的遗传标记系统,可以利用它们进行将来牙鲆雌核发育群体的鉴定分析。

杂合度作为一个反映群体遗传变异的重要参数其大小可以反映群体遗传变异的高低,从作者的分析结果可以看出,养殖群体的平均杂合度明显的低于自然群体,这与尤锋等(2001)利用同工酶和 RAPD 得到的结果以及 Sekino 等(2002)的结果是一致的,这主要是由于人工养殖条件下的封

闭群体比自然群体更容易发生瓶颈效应和近交衰退现象而加速种质的同质化,从而降低了群体的遗传多样性。类似的结果在栉孔扇贝(宋林生等, 2002)、大菱鲂(Coughlan *et al.*, 1998)、鲤鱼(Desvignes *et al.*, 2001)、大西洋鲑(Norris *et al.*, 1999)等重要的养殖品种中都有过报道。另外,作者还发现,虽然养殖群体的平均杂合度比自然群体低,但是二者在有效等位基因数上并没有太大的区别(养殖群体为 1.8—6.8;自然群体为 2.5—6.7),这表明自然群体正在经历着一些等位基因尤其是一些稀有等位基因丧失的危机,分析原因可能有以下 3 点:第一,80 年代末至 90 年代初期由于国际市场的大量需求,我国的自然牙鲆遭到大肆的捕捞,使得近几年自然群体的种群数量骤减,已由 50 年代初的年产 2000t 减至现在的不足 100t (估计值);第二,随着牙鲆工厂化育苗及养成技术的突破,其养殖在国内被广泛的开展起来,养殖鱼苗很可能会逃逸到自然环境中,影响到自然群体的遗传结构,Clifford 等(1998)就曾报道过由于人工孵化的大西洋鲑苗种的逃逸而使得自然群体的遗传多样性明显下降;第三,因为自然资源的衰退,人们已经开始有意识的通过人工放流来达到迅速增殖资源的目的,例如柳广东等(2000)于 1999 年 4 月在山东省威海市进行了牙鲆的人工放流,共放流 15600 尾鱼苗,半年后进行回捕,放流牙鲆在渔获牙鲆中占有相当高的比例,达到了 60%—80%,尽管增殖放流可以达到快速恢复种群数量的目的,但是其对自然牙鲆种质资源的影响是不言而喻的。从遗传学的角度来讲,遗传瓶颈的发生首先表现为等位基因尤其是稀有等位基因的消失,随着“瓶颈”的加剧就会表现出平均杂合度的降低,继而会造成物种生长速度和抗病力的下降,所以保护自然牙鲆的种质资源应引起人们的重视,采取切实有效的保护措施。

参 考 文 献

- 王 强,刘明华,张铁齐等,1996. 黑龙江水系不同水体野鲤群体的等位基因变异. 中国水产科学, 3(1): 11—16
- 尤 锋,王可玲,相建海等,2001. 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. 海洋与湖沼, 32(5): 512—518
- 杜长斌,孙孝文,楼允东,2000. 应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析. 上海水产大学学报, 9(4): 285—289
- 宋林生,李俊强,李红蕾等,2002. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群和养殖群体的遗传结构及其遗传分化的研究. 高技术通讯, 12(7): 83—86
- 陈 腾,张琳琳,赖江华等,2002. 中国东乡族 9 个 STR 基因座遗传多态性研究. 遗传, 24(3): 247—250
- 张亚平,王 文,宿 兵等,1995. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. 动物学研究, 16: 301—306
- 柳广东,张秀梅,高天翔等,2000. 山东省威海市牙鲆增殖放流实验研究. 海洋湖沼通报, 4: 78—82
- 黎中宝,邹志华,常建波,2003. 牙鲆群体生化遗传学研究——II. 等位酶的生化遗传分析. 中国生态农业学报, 11(3): 9—12
- Ardren W R, Borer S *et al.*, 1999. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. J Hered, 90(5): 529—536
- Botstein P, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphism. Am J Hum Genetic, 32: 314
- Clifford S L, Meginnity P, Feguson A, 1998. Genetic changes in an Atlantic salmon population resulting from escaped juvenile farm salmon. J Fish Biology, 52: 118—127
- Coimbra M, Kobayashi K, Koretsugu K *et al.*, 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 220: 203—218
- Coughlan J P, Imsland A K, Galvin P T *et al.*, 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. J Fish Biol, 52: 916—922
- Desvignes J F, Laroche J, Durand J D *et al.*, 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. Aquaculture, 194: 291—301
- Fisher R A, 1951. Standard calculations for evaluating a blood group system. Heredity, 5: 95—102
- Nei M, 1975. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 79—124
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583—590
- Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P, 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture, 180: 247—264
- O'Connell M, Wright J M, 1997. Microsatellite DNA in fishes. Rev Fish Biol Fish, 7: 331—363
- Sekino M, Hrara M, 2000. Isolation and characterization microsatellite DNA loci in Japan flounder *Paralichthys olivaceus*. Mol Ecol, 9: 2201—2203

Sekino M, Hrara M, Taniguchi N, 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 213: 101—122

You Feng, Xiang J H, Song L S *et al*, 2002. Genetic variations in natural and cultured stocks of Shandong *Paralichthys olivaceus* (T. & S.) as revealed by RAPD. *Studia Marina Sinica*, 44: 228—234

GENETIC VARIATIONS AT TEN MICROSATELLITE LOCI IN NATURAL AND CULTURED STOCKS OF LEFT-EYED FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS* IN SHANDONG COASTAL WATERS

WANG Wei, YOU Feng[†], GAO Tian-Xiang^{††}, ZHANG Pei-Jun[†]

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; College of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003*)

[†](*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

^{††}(*College of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003*)

Abstract Microsatellite, or Short Tandem Repeats (STRs), is one of the most efficient marker systems serving as a useful tool for various genetic studies, such as population genetics study, quantitative trait locus identification, parentage and kinship analysis, genetic linkage mapping, and so on. Left-eyed flounder *P. olivaceus* is a flatfish species widely distributed in the North Pacific and is becoming increasingly important cultured marine fish species in China, Japan and Korea. In this study, 20 natural and 20 cultured individuals were collected from Shandong coastal waters in the Yellow Sea and a fish farm in Jiaonan of Shandong Province in May of 2003. Genomic DNA was isolated with the phenol-chloroform method from muscle tissue or whole blood. The genetic variations of the two stocks of *P. olivaceus* were assessed at 10 microsatellite loci. Nine (*Po1*, *Po13*, *Po33*, *Po35*, *Po42*, *Po48*, *Po56*, *Po89*, *Po91*) of them were selected from 16 loci, which were isolated by Sekino *et al* in 2000. *Po-str1* primers were designed using Primer Premier 5.0 according to the microsatellite sequence of *P. olivaceus* from GenBank. The amplification was performed in an Eppendorf Mastercycler PCR reactor. The products were analyzed by electrophoresis in a 8% non-denatured polyacrylamide gel with 1 × TBE buffer, stained with ethidium bromide. The electrophoretic patterns were analyzed by ImageMaster1D Elite (Version 3.01) software. The results showed that the number of effective alleles (a_e) of each loci in the natural and cultured stocks were 1.8—6.8 and 2.5—6.7; average number of alleles per locus were 6.7 and 6.1 and values of average heterozygosity (H) were 0.8120 and 0.7310 respectively. Genetic similarity (I), genetic distance (D) and coefficient of gene differentiation (G_{ST}) between these two stocks were 0.8558, 0.1557 and 0.0558, respectively. Compared with allozyme and RAPD, microsatellite markers enable great genetic differentiation and provide more alleles. The average heterozygosity of cultured stock was lower than that of natural stock just like the results from other genetic analysis, which indicated that inbreeding in aquaculture caused decrease of genetic diversity. However, there was no significant differentiation between natural and cultured stocks in the number of effective alleles (a_e) of each locus suggesting that the natural stock of *P. olivaceus* was going through a decrease of some alleles, especially some low-frequency alleles. This may be a result of overfishing, escape of cultured fish offspring to the natural environment and intentional releasing. The value of polymorphism information content (PIC), power of discrimination (DP) and probability of paternity exclusion (PPE) were 0.59—0.84, 0.54—0.86 and 0.41—0.72 at the 10 loci of the natural stock, respectively. The results indicated that the 10 microsatellite loci selected were very sensitive and could be used in parentage and kinship determination of the artificial gynogenetic stock of left-eyed flounders and further genetic breeding studies.

Key words *Paralichthys olivaceus*, Natural and cultured stocks, Microsatellite, Genetic variation