

许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)微卫星标记开发 及野生、养殖群体遗传多样性分析*

韩承慧^{1,2} 马海涛^{2,3} 姜海滨² 刘阳^{1,2} 韩慧宗² 王斐²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006; 3. 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

摘要 对许氏平鲷进行简化基因组测序, 设计微卫星引物 200 对, 可稳定扩增的引物 190 对, 占 95%。利用一个荣成野生群体对 24 个多态性较高的微卫星标记进行了评价, 每个位点的等位基因数 (N_a) 为 2—21 个, 观测杂合度 (H_o) 为 0.0417—0.9167, 期望杂合度 (H_e) 为 0.0278—0.9722, 多态信息含量 (PIC) 为 0.1948—0.9496, 结果显示有 20 个微卫星位点为中高度多态。利用这些引物对荣成野生群体和烟台养殖群体的遗传多样性进行了比较分析, 野生和养殖群体的平均等位基因数 (N_a) 分别为 8.5000、6.9583, 有效等位基因数 (N_e) 的均值分别为 4.5484、3.6365, 期望杂合度 (H_e) 均值分别为 0.6421、0.5840, 多态信息含量均值 (PIC) 分别为 0.6088、0.5490, 平均香农-威纳指数均值为 1.4605、1.2834, 但 F 检验发现无显著差异, 发现两个群体的遗传多样性都处于高度多态水平, 但养殖群体遗传多样性水平低于野生群体。本研究结果说明许氏平鲷的人工繁育中, 通过使用较大数量的亲本进行繁育可有效防止选育群体的遗传多样性降低, 但人工定向选育对选育群体的遗传多样性也产生了一定的影响。Bonferroni 校正后在两个群体中各有 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡。本研究开发的微卫星标记为许氏平鲷遗传图谱构建、分子标记辅助育种等提供了更多标记选择, 对野生和养殖群体遗传多样性分析为下一步的遗传育种提供参考。

关键词 许氏平鲷; 微卫星; 野生群体; 养殖群体; 遗传多样性

中图分类号 Q789 **doi:** 10.11693/hyhz20150900235

许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*), 又称黑鲷, 属鲷形目 (Scorpaeniformes)、鲷亚目 (Scorpaenoidei)、鲷科 (Scorpaenidae)、平鲷亚科 (Sebastinae)、平鲷属 (*Sebastes*) (成庆泰等, 1987), 广泛分布于东海、黄海和渤海, 属于卵胎生鱼类 (冯昭信, 2003), 具有肉质鲜美、营养丰富、生长速度快、抗逆性强等优点, 是我国北方海区以及日本、韩国的重要养殖鱼类之一 (刘丽娟等, 2009)。目前养殖苗种以海捕野生苗为主要来源, 养殖成活率较低, 长期的过度捕捞也使许氏平鲷资源和遗传多样性遭到破坏, 因此, 进行其良种选育已成为保护我国许氏平鲷资源、促进其养殖业可

持续发展的必要手段 (刘立明等, 2010)。

微卫星 DNA 标记, 又称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR), 具有多态性高、稳定性高、信息含量大、共显性等特点 (徐莉等, 2002), 已经被广泛应用于水产动物分子标记与数量性状的相关分析、遗传结构分析、亲缘关系鉴定、遗传连锁图谱构建和 QTL 定位中 (Zhan *et al.*, 2005; 孙国华等, 2011; 王文琪等, 2012; 初冠因等, 2013)。

目前国内外对于许氏平鲷微卫星标记的研究处于起步阶段, 发表的微卫星标记较少。日本学者 Yoshida 等 (2005) 首先利用两重 PCR 扩增的方法获得

* 山东省良种工程项目“优质抗病速生鱼类良种选育”, 2005—2015; 现代农业产业技术体系项目, nycytx-50 号。韩承慧, 硕士研究生, E-mail: wahuihome@163.com

通讯作者: 姜海滨, 研究员, E-mail: haibinjiang326@163.com

收稿日期: 2015-09-09, 收修改稿日期: 2015-12-26

6 个微卫星标记; 韩国学者 An 等(2009)利用磁珠富集法获得了 14 个微卫星标记; Yasuike 等(2013)利用 454 测序法筛选了 17 个微卫星标记。国内方面, Bai 等(2011)运用磁珠富集的方法获得了 18 个微卫星标记; 初冠因等(2013)发表了 17 个许氏平鲈微卫星标记; 贾超峰等(2014)报道了 15 个具有多态性的微卫星标记。这些微卫星标记远远不能满足许氏平鲈群体遗传结构分析、遗传图谱构建和分子标记辅助育种的需要。本研究首次运用高通量测序的方法从许氏平鲈基因组中开发 24 个多态性较高的微卫星标记, 并利用其对野生群体和养殖群体的遗传多样性进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

许氏平鲈野生群体采自山东荣成附近海域, 养殖群体采自烟台泰华海洋科技有限公司(国家级黑鲷原种场)选育的长岛群体选育子一代, 子一代个体为混合群体随机取样。荣成野生群体和烟台养殖群体各取 36 尾, 活体采集部分鱼鳍样品后浸泡于 70%乙醇中, 带回实验室-20 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA(黄培堂, 2002)。1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取的基因组 DNA 的完整性, NanoDrop2000 分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。使用时稀释到 50 ng/ μ L。

1.3 微卫星引物的设计和筛选

选取完整性和纯度高的单个个体 DNA 送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行基因组高通量测序, 并对含有微卫星核心的序列设计引物, 选取 200 对微卫星引物送由上海生工生物工程有限公司合成。首先选用三个不同个体 DNA 模板进行初步筛选, 选出能稳定扩增的微卫星标记, 再通过温度梯度 PCR 进行退火温度的优化。优化后引物分别用 FAM(荧光颜色为蓝色)和 HEX(荧光颜色为绿色)进行标记(表 1), 将筛选得到的微卫星标记在野生群体中扩增, 对微卫星标记进行评价, 然后在养殖群体中扩增, 对野生群体和养殖群体的遗传多样性进行评价。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 2 μ L DNA 模板(50ng/ μ L), 2.5 μ L 10 \times buffer, 引物各 1 μ L (50 μ mol/L), 0.5 μ L dNTP (10 mmol/L), 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶(U/ μ L), 灭菌水补足。PCR 反应程序为: 94 预变性 5min, 94 变性 40s, 退火反应 40s, 72 延伸 1min, 30 个循环, 最后 72 延伸 10min。PCR 产物经由 1.5%琼脂糖凝胶电

泳检测后, 送至上海生工生物工程有限公司进行毛细管电泳。

1.4 数据的统计和处理

PopGene32 软件统计分析每一个位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、香农-威纳指数(I); GenePop 软件检验 Hardy-Weinberg 平衡, 并经 Bonferroni 校正; PIC Calc 6.0 计算每个位点的多态信息含量(PIC)。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

所提取的群体基因组 DNA 溶解于 50 μ L 的 T.E Buffer (pH=8.0)中, 浓度在 800—1000 ng/ μ L, 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示条带明显, 无拖带降解现象, 紫外分光光度计测定 OD_{260nm}/OD_{280nm} 在 1.8—1.9 之间, 说明样品 DNA 中蛋白质、RNA 等残存较少, 适合 PCR 扩增。

2.2 微卫星标记的多态性分析

共筛选出 24 个具有多态性的微卫星标记, 峰值多在 5000—40000 之间, 电泳条带清晰, 说明这些微卫星标记具有较高的可靠性, 能满足群体遗传多样性分析的需要(图 1)。24 对微卫星标记在野生群体表现出了较高的多态性(表 2), 在野生群体中共检测出 204 个等位基因, 每个微卫星位点的等位基因数(N_a) 在 2—21 之间, 平均等位基因数为 8.5 个, 其中位点 HJ6-30、HJ6-32、HJ6-57 和 HJ7-46 等位基因数最少, 各得到 2 个等位基因, 位点 HJ7-60 的等位基因数最多, 得到 21 个等位基因。有效等位基因数(N_e)为 1.3340—15.3373, 平均值为 4.5484; 观测杂合度(H_o) 为 0.0417—0.9167, 平均值为 0.6059; 期望杂合度(H_e) 范围为 0.0278—0.9722, 平均值为 0.6041; 多态信息含量(PIC)在 0.1948—0.9496 之间, 平均值为 0.6088, 其中高度多态的位点(PIC>0.5)有 14 个, 占总位点数的 58.33%, 中度多态位点(0.25<PIC<0.5)有 6 个, 占 25%, 低度多态位点(PIC<0.25)有 4 个, 占 16.67%。

2.3 Hardy-Weinberg 平衡检测

各个微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡检测结果表明(表 2), 在野生群体中 HJ6-18、HJ6-30、HJ6-31 和 HJ6-80 显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 偏离位点数占总位点数的 16.67%, 在养殖群体中 HJ6-19、HJ6-23、HJ7-60 和 HJ7-100 显著偏离平衡, 占总位点数的 16.67%。其余位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

表 1 24 对许氏平鲷微卫星引物特征
Tab.1 Characteristics of 24 pairs of microsatellite primers for *S. schlegeli*

位点	GenBank 号	重复基元	引物序列(5'—3')	退火温度 T_a ()	产物长度 (bp)
HJ6-10	KT260126	(CA) ₁₆	F: FAM-ATTCTCATTCTACCCCATCCCATT R: CTGGCTGAGCTAACACGCATT	60	150
HJ6-18	KT260127	(TA) ₁₆	F: HEX-TCGAGTGTATGCGATATATGGTACG R: GACATGGAAACTGCAACTTGACTG	50	130
HJ6-19	KT260128	(GT) ₁₀	F: HEX-TTGCAGACAGAATAAAAATTCACGG R: TGGCTTTACAACCATATCACTCCC	60	144
HJ6-23	KT260129	(TGC) ₁₀	F: FAM-GACGAGCTTCTTCCCATCAGG R: TGACCACACCATCACTAGAAGAGC	60	140
HJ6-30	KT260130	(AC) ₆	F: HEX-ACTGAGCAACACAAGATGAAGACG R: AGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG	60	159
HJ6-31	KT260131	(CA) ₇	F: HEX-CCGGTCTCTTTTCCTTCTGTCTT R: CTGTTCTGATGTAATGCGCTATGG	60	122
HJ6-32	KT260132	(TG) ₆	F: HEX-TGAGGCAAAGCATTACAAAATCTG R: ATGTTTTGGTGTCAATTACAGGCA	60	139
HJ6-56	KT260133	(TC) ₇	F: FAM-CACAACCTGCTGCCAATATTCATGT R: CCAAACCCCATACACACATACAG	60	158
HJ6-57	KT260134	(TG) ₆	F: FAM-AGTAATCTGACTGTCTGCGCTGC R: AAGGATACCACAAAGCATGGTCAC	60	143
HJ6-70	KT260135	(TAT) ₄	F: HEX-TTTTTGTGTGCCTAATCTGAACCA R: AAGGTGTTTCATGTGCATTTGTG	60	140
HJ6-80	KT260136	(TC) ₁₅	F: HEX-CCTCACAACCTTACCACCTCTCT R: TGCAGTAAATCCATTGTCGAAGAA	60	122
HJ7-2	KT260137	(AC) ₉	F: FAM-ACACACGTTCTTACAGAAGGACCC R: CAATGGCATAAATTGGTGTGAAA	60	144
HJ7-20	KT260138	(TG) ₁₃	F: HEX-AATCCTCTGATTACCTAGCCAGCA R: TACAGCGTTTGGTGTCTCTGAACT	62	127
HJ7-22	KT260139	(TG) ₁₄	F: HEX-AGTTAGCTGGGAAGGAAAAGCACT R: ACCTTACTGCACCTGTTCTCTTGG	62	109
HJ7-38	KT260140	(GGC) ₄	F: HEX-GCAATCGAATTACCGTCCATTTTA R: CAGCTCCACTGAACAGGACTAAGG	60	134
HJ7-44	KT260142	(GA) ₈	F: HEX-CTCCTCCTACTCCAGGGTCAAAGT R: CGCTGAACTCTAAGCAACCTCATT	60	117
HJ7-45	KT260143	(AAT) ₄	F: FAM-GCTGTGTGGCTCCTCTAACCTG R: TACTGATGGCAGAAGCTTCTTCTG	60	160
HJ7-46	KT260144	(GCA) ₅	F: HEX-TAGGCCTATGTGGCTCAAGGTA R: TCAATTTAAGGACATGCATCACA	60	117
HJ7-59	KT260145	(GT) ₁₀	F: FAM-AGCTTACCTGTACCTGAGTGTCCG R: CCGGCAGAGTAAAACAGACAAACT	60	141
HJ7-60	KT260146	(TG) ₁₅	F: FAM-ATATGTGTGAAGCTGCTGCATGTC R: TCAGGCAAATCAACACTAGTCAGC	60	128
HJ7-66	KT260147	(CA) ₈	F: FAM-AATCATGATGTTCCGATCGTCTT R: CACAGTACTCTACGCTCTACGGCA	62	155
HJ7-67	KT260148	(TAA) ₁₀	F: FAM-CCAGAATTGCTGTGGAAGAAAAGT R: CCTCTCCTTCTTTTCTCTCATCTT	62	143
HJ7-68	KT260149	(TCTA) ₄	F: FAM-ATCTGGTTCGAGATACAGGACAGT R: TTTCTAGTGACACATATTTCTGCCCTT	60	158
HJ7-100	KT260150	(AGGT) ₄	F: FAM-TTTCCAGGCAGGTAGGTAGTTAGG R: GGTGACAAAAGTTGAACATGTGAGG	60	160

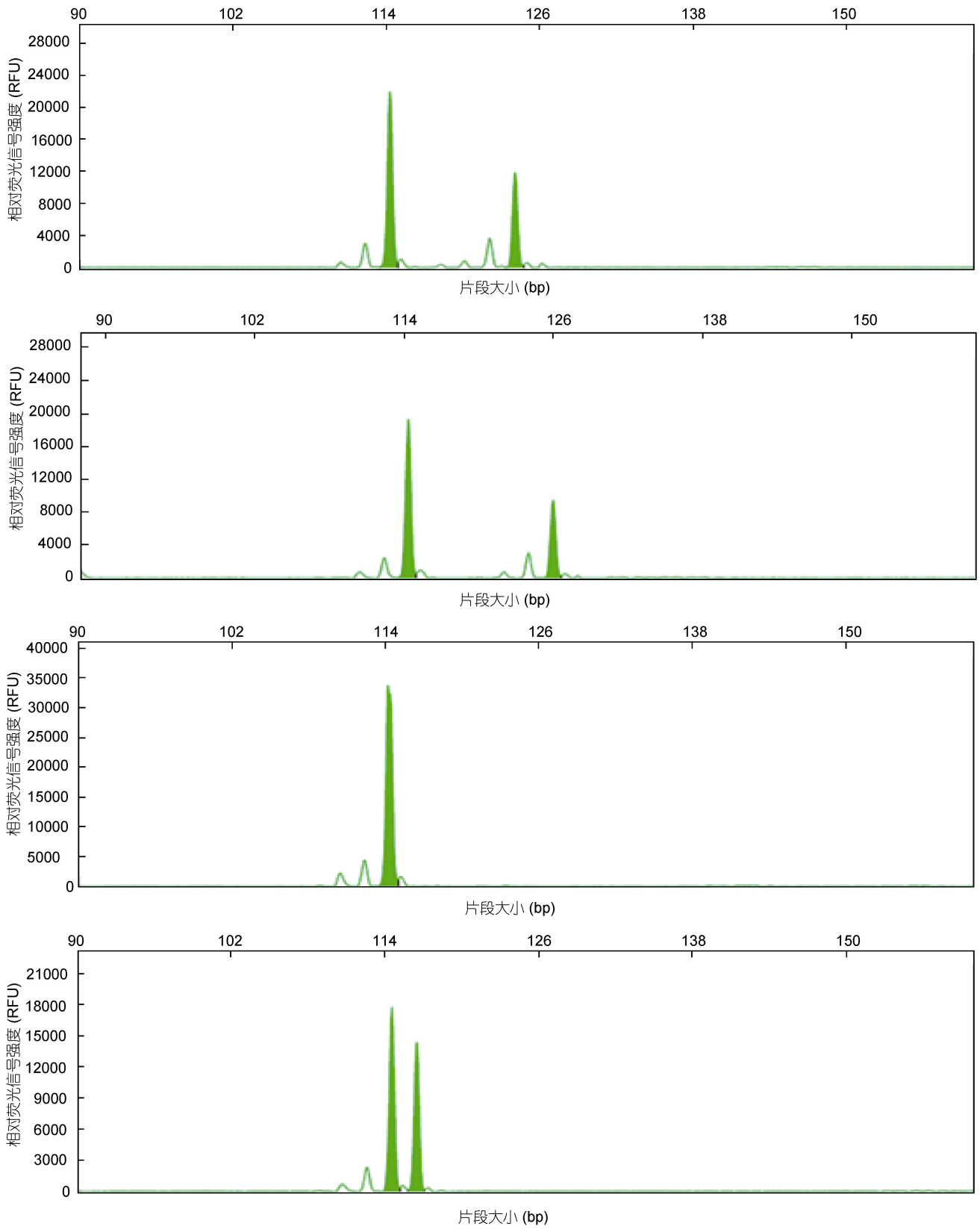


图 1 位点 HJ7-44 的部分毛细管电泳结果

Fig.1 Samples of capillary electrophoresis results for locus HJ7-44

表 2 24 对微卫星标记在野生群体和养殖群体中的遗传多样性参数
 Tab.2 Genetic diversity parameters of 24 microsatellite primers for wild and cultured populations of *S. schlegeli*

微卫星位点	群体	等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息含量 (PIC)	香农-威纳指数 (I)	Hardy-Weinberg (P)
HJ6-10	YS	8	4.9560	0.6667	0.8095	0.7674	1.7197	0.0606
	YZ	6	4.2702	0.7778	0.7766	0.7356	1.6143	0.1503
HJ6-18	YS	13	7.4057	0.6389	0.8772	0.8508	2.1971	0.0005*
	YZ	9	2.3060	0.6111	0.5743	0.5451	1.3082	0.4332
HJ6-19	YS	18	7.7373	0.9167	0.8830	0.8606	2.4290	0.9564
	YZ	14	5.7093	0.9444	0.8365	0.8053	2.0718	0.0004*
HJ6-23	YS	16	9.3237	0.8056	0.9053	0.8835	2.4311	0.2287
	YZ	13	9.2903	0.9722	0.9049	0.8825	2.3464	0.0010*
HJ6-30	YS	2	1.9985	0.9722	0.5067	0.3748	0.6928	0.0000*
	YZ	2	1.1484	0.1389	0.1311	0.1208	0.2522	1.0000
HJ6-31	YS	4	1.8215	0.0278	0.4574	0.4033	0.8312	0.0000*
	YZ	2	1.0571	0.0556	0.0548	0.0526	0.1269	1.0000
HJ6-32	YS	2	1.3846	0.3333	0.2817	0.2392	0.4506	0.5612
	YZ	2	1.2129	0.1944	0.1780	0.1601	0.3189	1.0000
HJ6-56	YS	6	3.5217	0.7222	0.7261	0.6660	1.4054	0.3286
	YZ	3	2.3845	0.6389	0.5888	0.5149	0.2522	0.3852
HJ6-57	YS	2	1.8215	0.2500	0.2218	0.1948	0.3768	1.0000
	YZ	4	1.1520	0.1111	0.1338	0.1282	0.3182	0.0156
HJ6-70	YS	6	2.2618	0.4722	0.5657	0.5169	1.1335	0.1777
	YZ	9	4.0725	0.8056	0.7653	0.7267	1.7138	0.0342
HJ6-80	YS	19	11.5200	0.8333	0.7422	0.9074	2.6757	0.0000*
	YZ	14	8.6400	0.9722	0.8967	0.8735	2.3333	0.0538
HJ7-2	YS	8	3.7295	0.8333	0.7422	0.7009	1.6088	0.3581
	YZ	8	2.8452	0.6667	0.6577	0.6208	1.4309	0.1337
HJ7-20	YS	12	8.0000	0.8056	0.8873	0.8634	2.2610	0.1482
	YZ	11	5.3665	0.8056	0.8251	0.7918	1.9447	0.0028
HJ7-22	YS	9	4.5474	0.7500	0.7911	0.9496	1.7204	0.1473
	YZ	10	6.0988	0.8333	0.8478	0.8180	2.0174	0.0154
HJ7-38	YS	4	1.3340	0.2778	0.2539	0.2384	0.5340	1.0000
	YZ	3	1.2186	0.1389	0.1819	0.1702	0.3771	0.2570
HJ7-44	YS	5	2.0506	0.5556	0.5196	0.4592	0.9634	0.2546
	YZ	4	2.7429	0.7500	0.6444	0.5730	1.1370	0.0338
HJ7-45	YS	5	2.0250	0.4722	0.5133	0.4254	0.8766	0.8105
	YZ	6	2.7284	0.6667	0.6424	0.5805	1.2092	0.1868
HJ7-46	YS	2	1.3846	0.2222	0.2817	0.2392	0.4506	0.2280
	YZ	2	1.2800	0.1944	0.2218	0.1948	0.3768	0.4337
HJ7-59	YS	12	5.0625	0.7222	0.8138	0.7839	1.9645	0.4337
	YZ	9	4.5000	0.8056	0.7887	0.7463	1.7247	0.0106
HJ7-60	YS	21	15.3373	0.8056	0.9480	0.9310	2.8524	0.0306
	YZ	14	7.0820	0.8333	0.8709	0.8459	2.2601	0.0000*
HJ7-66	YS	8	2.0523	0.4167	0.5200	0.4900	1.1574	0.0362
	YZ	5	2.0653	0.6111	0.5231	0.4797	1.0275	0.9435
HJ7-67	YS	9	3.3402	0.5556	0.7105	0.6743	1.5974	0.0893
	YZ	7	2.2958	0.5000	0.5724	0.5284	1.1802	0.0114
HJ7-68	YS	10	5.3030	0.9429	0.8232	0.7929	1.9398	0.9049
	YZ	7	5.5267	0.8889	0.8306	0.7955	1.8070	0.0049
HJ7-100	YS	3	1.7851	0.5000	0.4460	0.3988	0.7834	1.0000
	YZ	3	2.2797	0.8611	0.5692	0.4847	0.9293	0.0000*
平均值	YS	8.5000	4.5484	0.6041	0.6421	0.6088	1.4605	
	YZ	6.9583	3.6365	0.6157	0.5840	0.5490	1.2834	

*表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; 野生群体用 YS 表示, 养殖群体用 YZ 表示

2.4 野生和养殖群体遗传多样性分析

将筛选得到的 24 个微卫星标记在养殖群体中扩增, 结果如下; 养殖群体的等位基因数(N_a)为 2—14 个, 平均值为 6.9583 个; 有效等位基因数(N_e)为 1.0571—9.2903, 平均值为 3.6365; 观测杂合度(H_o)范围为 0.0556—0.9722, 平均值为 0.6157; 期望杂合度(H_e)为 0.0548—0.9049, 平均值为 0.5840; 多态信息含量(PIC)为 0.0526—0.8825, 平均值为 0.5490; 野生群体和养殖群体的香农-威纳多样性指数为 0.3768—2.8524、0.1269—2.3464, 平均值分别为 1.4605 和 1.2834, 比较野生群体和养殖群体这六组数据的均值, 除观测杂合度(H_o)外, 野生群体都高于养殖群体, 但对以上六组数据 F 检验无显著差异。说明许氏平鲉野生群体的遗传多样性高于养殖群体的遗传多样性, 但是两者之间的差异并不显著。

3 讨论

微卫星标记是分子遗传研究中的一种重要手段, 其获得的方法有多种; 基因组文库法、微卫星富集法、数据库查找法、近缘物种筛选法等(孙波等, 2009)。本研究首次使用高通量测序的方法从许氏平鲉基因组中开发微卫星标记, 设计微卫星引物 200 对, 结果得到了 190 对可稳定扩增的引物, 占 95%, 其中 24 对微卫星引物具有较高多态性, 证明这种方法可用于许氏平鲉基因组微卫星标记的大规模开发。Weber(1990)认为只有在 2 碱基重复序列次数达到 12 次时微卫星标记才能表现出较高的多态性。低度多态($PIC < 0.25$)的位点有四个, 分别是 HJ6-32 和 HJ6-57 为两碱基 6 重复, HJ7-38 为三碱基 4 重复和 HJ7-46 为三碱基 5 重复, 中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)的位点有 4 个, HJ6-30、HJ6-31、HJ7-66 为两碱基重复, 最多重复次数只有 8 次, HJ7-100 为四碱基重复 4 次, 以上 8 个位点的核心序列重复均少于 12 次, 相反核心序列重复次数多于 12 次的微卫星标记均检测出较高的杂合度和丰富的多态性, 这种现象在诸氏鲷虾虎、三疣梭子蟹、中国明对虾(蔡磊等, 2015)中也有报道, 因此在设计引物时应选用核心序列重复单元的重复次数在较高水平的序列, 从而避免筛选过程中得到较多低多态性的微卫星标记。

24 个微卫星位点在野生群体中共检测出 204 个等位基因, 每个位点扩增出的等位基因数目 2—21 个不等, 明显高于贾超峰等(2014)观测到的 2—14 个和初冠因等(2013)观测到的 2—8 个, 这可能与所选用的

检测方法有关, 以上两者选用的为聚丙烯酰胺凝胶电泳, 此种方法分辨率较低, 微卫星因其多态性较高, 核心重复次数相差较少的两条等位基因条带可能相近, 导致条带判读产生误差。本实验选用的是毛细管电泳, 毛细管电泳技术因其高灵敏度、高分辨率、高速度、低耗样等优势, 已经逐步代替了经典电泳技术(毛煜等, 2001), 得到的结果分辨率和准确性更高。

24 个微卫星标记在野生群体和养殖群体中各有四个位点显著偏离了 Hardy-Weinberg 平衡, 主要原因是纯合子过剩。野生许氏平鲉营半定居生活, 活动范围较小, 这种生活习性有可能造成近亲交配, 从而出现微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡现象; 而养殖群体所用的亲本数量一般比较少, 也可能造成近亲交配并出现微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡现象。另外, 无效等位基因的存在也能导致微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡现象。研究表明在海洋经济鱼类、贝类、棘皮类的养殖群体中被检测位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象普遍存在(耿慧君等, 2009)。

最大限度地维持种内遗传多样性水平, 是持续利用种质资源的前提和基础。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(Allendorf *et al*, 1987)。多态信息含量(PIC)是指一个后代所获的某个等位基因标记来自它亲本的同一个个等位标记的可能性大小(彭银辉等, 2008), 野生群体和养殖群体的平均 PIC 值均大于 0.5, 表明两个群体均表现出较高的遗传多样性。野生群体的等位基因数、有效等位基因数、Shannon's 指数、期望杂合度和多态信息含量的平均值都高于养殖群体, 但对以上参数进行 F 检验后发现均无显著差异($P > 0.05$)。一方面, 本结果说明许氏平鲉养殖群体仍保持有较高的遗传多样性, 原因可能与养殖群体的亲本数量较大和选育代数较少有关, 我们在进行许氏平鲉群体选育时, 一般会选择较大数量的优质个体作为亲本, 从而有效地防止由于亲本数量太少而造成选育子代遗传多样性降低的风险; 另外由于本研究所用养殖群体为群体选育子一代, 较少的选育代数减少了近亲交配风险的发生, 从而也避免了选育子代遗传多样性降低的发生。另一方面, 单从数据上看野生群体的遗传多样性略高于养殖群体, 这说明人工定向选育对选育群体的遗传多样性也产生了一定的影响, 这提醒我们在下一步的良种选育中, 应进一步采取避免选育群体遗传多样性降低的措施,

如定期补充野生个体作为亲本等, 并利用微卫星标记对其选育后代继续进行遗传监控, 从而达到较好的选育效果。

本研究开发的 24 对许氏平鲷微卫星标记为其遗传连锁图谱构建和分子标记辅助育种提供了更多标记选择, 对野生群体和养殖群体的遗传多样性分析结果也为下一步的新品系选育提供了参考。

参 考 文 献

- 王文琪, 张毅, 刘梦侠等, 2012. 许氏平鲷 4 个野生群体遗传多样性微卫星分析. 海洋科学, 36(1): 10—16
- 毛煜, 徐建明, 2001. 毛细管电泳技术和应用新进展. 化学研究与应用, 13(1): 4—9
- 冯昭信, 2003. 鱼类学(海洋渔业专业用). 北京: 中国农业出版社, 191
- 成庆泰, 郑葆珊, 1987. 中国鱼类系统检索(下册). 北京: 科学出版社, 462—463
- 刘立明, 杜荣斌, 孙颖民等, 2010. 黑鲷苗种培育关键技术的研究. 海洋科学, 34(3): 1—5
- 刘丽娟, 任利华, 姜向阳等, 2009. 黑鲷(*Sebastes schlegeli*)遗传多样性的等位酶研究. 海洋与湖沼, 40(4): 479—483
- 孙波, 鲍毅新, 赵庆洋等, 2009. 微卫星位点获取方法的研究进展. 生物学杂志, 28(10): 2030—2137
- 孙国华, 杨建敏, 孙孝德等, 2011. 刺参微卫星标记与生长性状体重、体长的相关分析. 水产学报, 35(4): 501—508
- 初冠囡, 姜黎明, 于海洋等, 2013. 卵胎生鱼许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)雌亲家系的微卫星鉴定. 海洋与湖沼, 44(3): 670—676
- 耿慧君, 周遵春, 董颖等, 2009. 中间球海胆野生和养殖群体遗传结构的微卫星分析. 水产学报, 33(4): 549—556
- 贾超峰, 马海涛, 姜海滨等, 2014. 许氏平鲷微卫星标记的开发及评价. 上海海洋大学学报, 23(3): 345—350
- 徐莉, 赵桂仿, 2002. 微卫星 DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用. 西北植物学报, 22(3): 714—722
- 黄培堂, 2002. 分子克隆实验指南(第三版: 上册). 北京: 科学出版社, 483
- 彭银辉, 刘楚吾, 郭昱嵩等, 2008. 三种笛鲷的野生群体和养殖群体遗传多样性的微卫星分析. 农业生物技术学报, 16(5): 810—814
- 蔡磊, 陈小曲, 郑伟强等, 2015. 诸氏鲷虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价. 中国实验动物学报, 23(1): 57—62
- Allendorf F W, Ryman N, 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: Ryman N, Utter F eds. Population Genetics and Fishery Management. Seattle: University of Washington Press, 141—159
- An H S, Park J Y, Kim M J *et al*, 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers for the heavily exploited rockfish *Sebastes schlegeli*, and cross-species amplification in four related *Sebastes* spp. Conservation Genetics, 10(6): 1969—1972
- Bai C C, Liu S F, Zhuang Z M *et al*, 2011. Isolation and characterization of microsatellite markers for the Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. Genetics and Molecular Research, 10(3): 2065—2068
- Weber J L, 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. Genomics, 7(4): 524—530
- Yasuike M, Noda T, Fujinami Y *et al*, 2013. Tri-, tetra- and pentanucleotide-repeat microsatellite markers for the Schlegel's black rockfish *Sebastes schlegelii*: the potential for reconstructing parentages. Conservation Genetics Resources, 5(2): 577—581
- Yoshida K, Nakagawa M, Wada S *et al*, 2005. Multiplex PCR system applied for analysing microsatellite loci of Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegeli*. Molecular Ecology Notes, 5(2): 416—418
- Zhan A B, Bao Z M, Wang X L *et al*, 2005. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. Fisheries Science, 71(6): 1341—1346

ISOLATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR BLACK ROCKFISH *SEBASTES SCHLEGELI* AND GENETIC DIVERSITY OF WILD AND CULTURED POPULATIONS

HAN Cheng-Hui^{1,2}, MA Hai-Tao^{2,3}, JIANG Hai-Bin², LIU Yang^{1,2}, HAN Hui-Zong², WANG Fei²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract We designed 200 pairs of microsatellite primers after a simple genome sequencing of *Sebastes schlegeli*, of which 190 pairs displayed objective band, and we examined 24 polymorphic microsatellite markers in Rongcheng wild population. The allele number of these markers ranged 2—21 per locus, the observed and expected heterozygosity values ranged 0.0417—0.9167 and 0.0278—0.9722, and the polymorphism information content ranged 0.1948 to 0.9496. Results revealed 20 microsatellite markers in middle or high polymorphism. Comparison between Rongcheng wild population and Yantai cultured population with these markers shows: the mean allele number and the effective allele number were 8.5000, 6.9583, and 4.5484, 3.6365, respectively; the values of average expected heterozygosity were 0.6421 and 0.5840; the mean PIC were 0.6088 and 0.5490; the mean value of Shannon-Weiner index were 1.4605 and 1.2834; however, the difference is not statistically significant. High-genetic diversity was maintained in both wild and hatchery populations, but polymorphism of cultured population was lower than the wild, indicating a large number of broodstocks avoided the decreasing of genetic diversity in artificial breeding, but directional breeding affected the genetic diversity of breeding populations. Four loci significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction in each population. These markers will be useful for genetic linkage map construction and molecular marker-assisted selection for *S. schlegeli*.

Key words *Sebastes schlegeli*; microsatellite; wild population; cultured population; genetic diversity