

进口大菱鲂 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析*

申雪艳 官庆礼[†] 雷霖霖^{††} 孔杰^{††1)} 翟介明^{††} 李波^{†††}

(中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003;农业部海洋渔业资源可持续利用重点
开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

[†](中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)

^{††}(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产
研究所 青岛 266071)

^{†††}(莱州明波水产有限公司 莱州 261400)

提要 利用随机扩增多态性 DNA(RAPD)和微卫星两种分子标记技术分析了从法国(F)、英国(E)、西班牙(S)引进我国的三个大菱鲂群体的遗传结构。20个 RAPD 随机引物对每个群体各 20 尾大菱鲂的基因组 DNA 进行扩增,共获得 125 个重复性好且谱带清晰的 RAPD 标记,片段大小在 200—2500bp 之间,三群体的多态位点比例在 12.80%—20.00% 之间,Nei 基因多样性指数在 0.0142—0.0352 之间,Shannon 多样性指数在 0.0423—0.0720 之间。微卫星引物的分析结果与 RAPD 一致。总体上,三个群体的遗传多样性均较低,其中西班牙群体遗传多样性水平最高,英国群体次之,而法国群体最低。利用 Shannon 多样性指数和 Nei 多样性指数估算群体遗传变异的来源,两者得出一致的结论:群体间遗传分化很弱。AMOVA 分析结果进一步证实了 Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数的分析结果:群体的遗传变异有 97% 以上是由群体内个体间的遗传变异引起的,遗传变异主要来自于群体内个体间,显著性检验表明群体间的变异对总变异的影响不显著。实验结果证明我国进口大菱鲂群体种质较单一。

关键词 大菱鲂,种群,RAPD,微卫星,遗传变异

中图分类号 Q75

大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)英文名 Turbot,属硬骨鱼纲、鲽形目、鲆科、菱鲆属,是一种适应低温的底层肉食性鱼类,自然分布于大西洋东侧欧洲沿岸,从北欧南部(冰岛和挪威)直至北非北部(摩洛哥),地中海和黑海(Blanquer *et al.*, 1992)也有分布。大菱鲂具有生长迅速、性格温顺、肉味鲜美、易于适应养殖环境等特点,其养殖在欧洲已形成产业化,发展前景受到世界各国的重视(杜佳垠, 2001)。我国于 1992 年首次引进大菱鲂,自 1999 年突破生产性育苗技术以来,大菱鲂养殖在我国北方沿海得到迅速发展,逐渐成为我国重要的养殖品种(雷霖霖, 2000;马爱军等,

2002)。实践证明,大菱鲂在我国具有很大的养殖潜力。随着大菱鲂养殖规模的不断扩大,对苗种的需求量也越来越大(雷霖霖等, 2003)。尽管国内近年来苗种生产能力不断上升,年产数百万乃至上千万尾,但是由于白化率高(朱杰等, 2002),质量较差,每年仍需从国外引进 100—150 万尾优质原色苗种(雷霖霖, 2002a, b)。然而在广泛引种过程中并没有对苗种的遗传品质引起重视。由于不了解引进苗种的遗传背景,因此在亲鱼的选择和配种时盲目性就很大,存在着近交衰退现象,导致养殖群体成活率、孵化率低,死亡率、白化苗率高等系列问题。因此很有必要对我国引进的大

* 国家“863”计划资助项目,2001AA620207 号。申雪艳,硕士,E-mail:sxuayan@163.com

1) 通讯作者:孔杰,研究员,E-mail:kongjie@sina.com

收稿日期:2003-10-23,收修改稿日期:2004-02-06

菱鲂群体进行遗传多样性研究。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic of DNA, RAPD) 和微卫星多态性 (Microsatellite polymorphisms, 又称“简单序列重复”, simple sequence repeat, SSR) 技术是近年来发展起来的 DNA 标记技术, RAPD 是一种高效的检测 DNA 多态性的方法, 在许多鱼种的遗传多样性研究上都有报道 (尤锋等, 1999; 李星云等, 2003)。微卫星 DNA (Microsatellite DNA) 以 1—6bp 的短核苷酸为基本单位, 呈串联重复状广泛分布于生物体整个基因组, 具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、呈孟德尔共显性遗传等特点, 因此在测定种群的杂合度上将更加精确和高效。本研究中采用 RAPD 和 SSR 技术, 对进口大菱鲂群体进行遗传分析, 旨在从分子水平了解进口大菱鲂的遗传多样性背景, 为有效地利用大菱鲂种质资源奠定基础, 以推动我国大菱鲂养殖业的健康、持续、稳定发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样本 3 个大菱鲂 (*Scophthalmus maximus* L.) 群体均为体长 4—5cm 左右的商品幼鱼 (人工繁殖苗种), 于 2002 年 6 月分别从法国 France Turbot 公司 (用 F 表示)、西班牙 Pescanova 渔业集团 (用 S 表示) 和英国 Mannin Seafarms 公司 (用 E 表示) 进口的大菱鲂中随机取样 50 尾, 活体运至实验室后置于 -80℃ 冰箱中保存。

1.1.2 试剂 20 个 10bp RAPD 随机引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶均购自上海生工生物工程有限公司。4 对微卫星引物均是根据 Iyengar 等 (1999, 2000) 发表的序列, 委托北京九发金生物有

限公司合成, 引物序列见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取方法 基因组 DNA 的提取参照邹曙明等 (2001) 的方法, 稍加改动。取约 150mg 大菱鲂背部肌肉组织剪碎, 放入 1.5ml Eppendorf 管内, 加入 540 μ l STE 缓冲液 (30mmol/L Tris·HCl, pH 8.0, 200mmol/L EDTA, pH 8.0, 50mmol/L NaCl), 混匀后加入 SDS 至终浓度为 1%、RNaseA 至终浓度为 20 μ g/ml, 37℃ 温浴 0.5h, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 200 μ g/ml, 45℃ 水浴消化至溶液澄清。冷却后加入等体积的饱和酚 (pH 8.0)、酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1)、氯仿: 异戊醇 (24: 1), 抽提后取上清, 加入 2 倍体积的乙醇 (75%) 沉淀 DNA, 收集絮状沉淀, 用 70% 乙醇洗涤两次, 干燥后加入适量 TE (10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.1mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解。DNA 定量通过 GENE QUANT proRNA/DNA 定量分析仪和琼脂糖电泳-EB 染色的荧光强度双重测定。

1.2.2 RAPD 及其产物检测 PCR 反应混合物中含 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l (成分: 100mmol/L Tris-Cl, 500mmol/L KCl, 2.0mmol/L MgCl₂, 1.3mg/ml BSA, 0.01% Gelatin, pH 8.4), 0.2mmol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 引物, 约 20ng 基因组 DNA, 1U *Taq* 酶 (Promega), 反应总体积为 25 μ l。反应程序为: 94℃ 预变性 5min 后进入 45 个循环, 每个循环包括 94℃ 1min、37℃ 1min、72℃ 2min, 最后在 72℃ 延伸 10min。每次反应均设不含模板的空白对照。扩增产物 (取 6 μ l) 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 用 Gel Doc 1000 凝胶成像仪进行图像处理。

表 1 微卫星座位、引物序列和 PCR 反应条件

Tab.1 Four polymorphic dinucleotide microsatellite loci, including Primer sequence and reaction condition of PCR

位点	重复序列	引物序列	退火温度 (°C)	MgCl ₂ 浓度 (mol/L)
<i>Smax</i> -03	(AC) ₁₆	5'-GACGGAGTGATGTTAACTGG 5'-TCAGAACTACAGCTGCTCTC	66	2.0
<i>Smax</i> -04	(TG) ₂₀	5'-TCACAAAATCTGAACATCGG 5'-GTAATCCACCAAACCTGAACG	65	1.5
<i>B18</i> -II CA ₇₀	(CA) ₇₀	5'-CAGAGGGATAATTCTGTGC 5'-TACTGGCATCATGCTCAAC	68	2.0
<i>T/1 TC18</i>	(TG) ₁₈	5'-GAGAAACTGAGCGTAGTCAC 5'-AATGATTATCACCGCTGCAC	67	2.5

1.2.3 微卫星及其产物检测 优化的微卫星 PCR 反应体系 (25 μ l) 中含 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l (成分: 100mmol/L Tris-Cl, 500mmol/L KCl, 2.0mmol/L MgCl₂, 1.3mg/ml BSA, 0.01% Gelatin, pH 8.4), 0.2mmol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 引物, 约 100ng 基因组 DNA, 1U *Taq* 酶 (Promega), MgCl₂ 1.5—2.5mmol/L (因各个座位而异, 其用量见表 1) 采用 “Touchdown” 法建立 PCR 热循环反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min、复性 40s (此时的退火温度为起始退火温度, 因各个座位而异, 见表 1), 72 $^{\circ}$ C 1min, 进行 10 个循环, 每 1 个循环降低一度, 然后以 10 个循环后的温度为退火温度, 进行 20 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。每次反应均设不含模板的空白对照。扩增产物采用 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 1h, 银染方法显色分型。

1.3 数据统计与分析

对 RAPD 数据进行统计, 根据电泳结果, 将每个条带看作是一个位点, 扩增条带有且清晰记为 1, 否则记为 0, 构建原始数据表征矩阵; 在微卫星数据统计时, 将微卫星分子遗传标记 (电泳图谱中的每一条 DNA 片段) 作为等位基因处理。RAPD 扩增结果采用两类方法进行分析, 一是将标记视为表型性状, 直接利用原始二元数据矩阵 (表型矩阵) 进行计算, 如 Shannon 信息指数及 AMOVA (Analysis of Molecular Variation, 分子方差分析) 分析; 二是将每一条带作为一个位点, 进行 Hardy-Weinberg 平衡假设, 转换成基因频率矩阵后进行统计, 如 Nei 分析。本实验中对中国进口大菱鲆群体遗传结构的分析主要包括群体内遗传变异水平的检测以及群体间遗传分化程度的评价两个方面。统计的遗传学参数主要如下:

1.3.1 多态位点比例 P $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$

1.3.2 Shannon 多样性指数 H 群体内基因多样性指数: $H_0 = - \sum X_i \ln X_i / N$, X_i 表示位点 i 在某一群体中的出现频率, N 表示该群体中检测到的位点总数。

n 个不同群体内的平均多样性: $H_{\text{POP}} = - \sum H_0 / n$, n 为研究的群体数。

群体多样性: $H_{\text{SP}} = - \sum X \ln X / n$, X 为位点 i 在 n 个群体中的总显性频率。

根据此计算, 群体内及群体间遗传多样性所占的比例: $H_{\text{POP}} / H_{\text{SP}}$, $(H_{\text{SP}} - H_{\text{POP}}) / H_{\text{SP}}$

1.3.3 Nei 基因多样性指数 H_0 和基因分化系数 G_{st} $H_0 = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为单个位点上的等位基因的频率。

G_{st} 是衡量群体间遗传分化的指标, 为总群体平均杂合度 (H_t) 和各群体内平均杂合度 (H_s) 的函数, 即 $G_{st} = 1 - H_s / H_t$ 。

$H_t = 1 - J_i$; $H_s = 1 - (\sum J_i) / S$ 。其中, S 为群体数目; J_i 为第 i 个群体内的基因一致性。

1.3.4 平均杂合度 (H_e) $H_e = [\sum (1 - \sum X_i^2)] / N$, 其中 X_i 是第 i 个等位基因出现的频率, N 为基因位点个数。

1.3.5 群体间的遗传相似度 (I) 和遗传距离 (D) RAPD 分析计算公式: 据 Nei (1978) 的方法计算。 $I = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$; $D = 1 - I$ 。其中 N_x 和 N_y 分别为群体 x 和 y 的扩增多态 DNA 片段数; N_{xy} 为两群体间相同的片段数。

微卫星分析计算公式: $I = \sum (X_i Y_i) / (\sum X_i^2 \sum Y_i^2)^{1/2}$; $D = - \ln I$ 。其中 X_i 、 Y_i 分别为 x 和 y 群体第 i 个等位基因频率。

1.3.6 AMOVA 分析群体遗传结构 由 ARLEQUIN 软件中的 AMOVA 方法, 计算群体间及群体内的方差组分 σ_a^2 、 σ_b^2 期望值, 分别计算群体间和群体内变异对总遗传变异 σ^2 的贡献率。相应的 Φ -statistics (Φ_{st}) 由以下公式计算:

$$\Phi_{st} = \sigma_a^2 / \sigma_T^2$$

Φ_{st} 反映群体间的遗传分化, 同时检验群体间及群体内变异对总遗传变异影响的显著性水平。

2 结果

2.1 DNA 提取

提取的大菱鲆基因组 DNA 电泳带整齐无 RNA 杂质、无拖尾、无降解, 分子量大于 20kb。DNA 产量为 2—5 μ g, $OD_{260/280}$ 值在 1.8—1.9 之间。

2.2 RAPD 扩增结果

20 个随机引物均可以扩增出清晰稳定的谱带, 其中 11 个引物在所有的受试个体间呈现单态, 其余 9 个引物产生多态 (图 1 示引物 S120 和引物 S198 的单态和多态现象)。共获得了 125 条清晰的条带, 每个引物扩增的 RAPD 条带数目在 3—10 之间, 平均为 6.2 条, DNA 扩增片段大小分布在 0.2—2.5kb 之间。所用引物的 DNA 序列及 RAPD 的扩增片段数, 如表 2 所示。

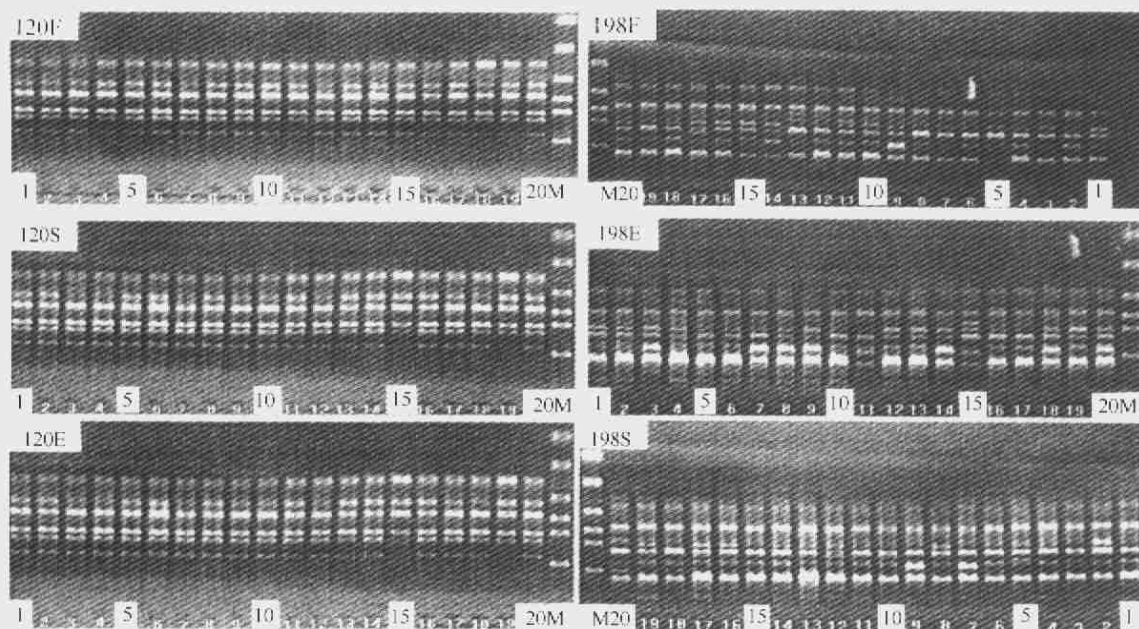


图1 引物 120、198 对大菱鲂群体的 RAPD 扩增图谱

Fig.1 RAPD amplification profiles generated by primer 120 and 198

a. 引物 120 单态性, b. 引物 198 多态性, M: DL-2000

表 2 不同引物序列及 RAPD-PCR 扩增结果

Tab.2 Primer sequence used and the amplified results obtained from different primers

引物	序列(5'—3')	RAPD 位点数	引物	序列(5'—3')	RAPD 位点数
S103	AGACGTCCAC	5	S173	CTGGGGCTGA	5
S104	GGAAGTCGCC	3	S178	TGCCCAGCCT	9
S109	TGTAGCTGGG	3	S183	CAGAGGTCCC	8
S113	GACGCCACAC	5	S185	TTTGGGGCCT	6
S115	AATGGCGCAG	4	S188	TTCAGGTTGG	8
S118	GAATCGGCCA	5	S189	TCCTGGTCCC	8
S120	GGGAGACATC	6	S193	GTCGTTCCTG	9
S126	GGGAATTCGG	6	S194	AAAGGGGTCC	6
S139	CCTCTAGACC	5	S198	CTGGCGAACT	7
S171	ACATGCCGTG	7	S199	GAGTCAGCAG	10

2.3 微卫星扩增结果

4 对微卫星引物在 3 个大菱鲂群体中均可以扩增出清晰稳定的谱带, 扩增片段的大小范围为 147—333bp (部分扩增结果如图 2 所示)。其中 *Smax-03* 有 4 个等位基因、*Smax-04* 有 2 个等位基因、*B18-II CA₇₀* 有 9 个等位基因、*T/1TC18* 有 3 个等位基因。根据个体基因型计算 3 个群体中每一微卫星座位的等位基因频率, 发现 *Smax-04* 在西班牙群体中表现多态, 在英国、法国群体中表现单态; *T/1TC18* 在法国群体中表现单态, 在英国、西

班牙群体中表现多态(表 3)。

2.4 群体内遗传变异

2.4.1 多态位点比例 20 个 RAPD 引物共扩增出 125 个位点, 总的多态百分率为 24.00%。西班牙群体检测到的多态位点最多, 为 25 个; 法国群体多态位点比例最小, 为 12.80%。大菱鲂各群体之间的多态位点百分比在 12.80%—20% 之间。微卫星数据揭示的多态位点比例与 RAPD 基本一致, 法国群体多态位点比例最小, 西班牙群体多态位点比例最大(表 4)。

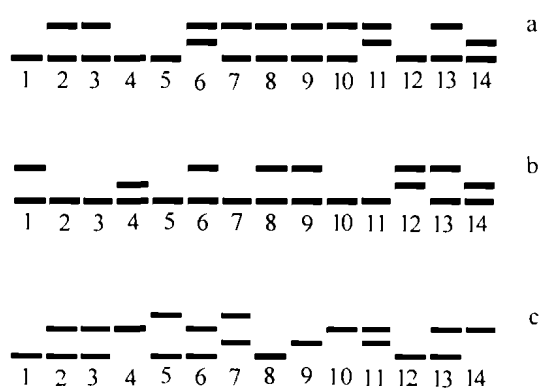


图2 三群体在微卫星座位 *Smax-03* 的部分扩增结果
Fig.2 Electrophoresis of PCR products of the microsatellite marker *Smax-03* from three populations

2.4.2 群体内遗传多态度 由 Shannon 多样性指数估算的遗传多态度的统计结果见表4。RAPD 分析得出各群体遗传多样性的高低依次为: $S > E > F$ 。进口大菱鲆群体种内总的多样性指数为 0.0744, 由 Shannon 多样性指数估算的遗传变异有 91.24% 存在于群体内, 8.74% 的变异存在于群体间。微卫星的分析得出的各群体遗传多样性的趋势结果与 RAPD 结果一致, Shannon 多样性指数估算的遗传变异有 86.79% 遗传变异存在于群体内, 13.21% 的变异存在于群体间。

2.4.3 Nei 基因多样性指数 根据 RAPD 分析, 大菱鲆群体 Nei 基因多样性指数分别为 0.0352(S)、0.0142(F)、0.0265(E), 基因多样性的

表3 三群体在4个微卫星座位的等位基因频率

Tab.3 Allele frequencies of 4 microsatellites loci in the three populations

位点	大小(bp)	等位基因数目	各群体等位基因频率		
			西班牙群体 S	法国群体 F	英国群体 E
<i>Smax-03</i>	294	4	0.5500	0.8250	0.6750
	298		0.3000	0.1250	0.3250
	300		0.1000	0.0500	0.0000
	304		0.0500	0.0000	0.0000
<i>Smax-04</i>	142	2	1.0000	0.9750	0.7500
	150		0.0000	0.0250	0.2500
<i>B18-II CA70</i>	281	9	0.0500	0.0750	0.2250
	286		0.3750	0.1750	0.2750
	293		0.1500	0.0750	0.0250
	298		0.2750	0.2250	0.0250
	312		0.0250	0.1500	0.2000
	320		0.0250	0.0250	0.2500
	326		0.1000	0.0750	0.0000
	330		0.0000	0.1250	0.0000
	338		0.0000	0.0750	0.0000
<i>T/17C18</i>	162	3	0.5250	1.0000	0.8250
	166		0.3500	0.0000	0.1000
	170		0.1250	0.0000	0.0750

排列顺序与 Shannon 多样性指数完全一致, 西班牙群体基因多样性最高(0.0352), 法国群体基因多样性最低(0.0142), 结果见表4。由 Nei 指数统计的大菱鲆群体内遗传多样性平均为 0.0354。

2.4.4 平均杂合度 对微卫星扩增结果进行分析, 统计各个群体的等位基因组成, 计算了各微卫星座位等位基因分别在三个群体的基因频率(表2)并计算每个微卫星位点的平均杂合度期望

值 H_e 。三群体平均杂合度的排列顺序为 $S > E > F$, 与 RAPD 分析得出的 Nei 基因多样性指数的结

表 4 大菱鲂 3 个群体的遗传多样性参数

Tab.4 Parameters of genetic diversity for 3 populations of *S. maximus*

群体	多态位点比例 (%)		Shannon 多样性指数		Nei 基因多样性指数		平均杂合度	
	SSR	RAPD	SSR	RAPD	SSR	RAPD	SSR	RAPD
S	100	20.00	0.9019	0.0720	—	0.0352	0.4822	—
F	72	12.80	0.6849	0.0423	—	0.0142	0.3019	—
E	75	14.40	0.8299	0.0571	—	0.0265	0.4719	—

2.5 群体间遗传分化

2.5.1 遗传分化系数 G_{st} 和 Φ_{st} 根据 Nei 指数及 AMOVA 分析估算的群体间的遗传分化系数 G_{st} 和 Φ_{st} 列于表 5。由表可以看出,由 RAPD 和微卫星分析得出的大菱鲂 3 个群体的遗传分化系数是一致的,整体分化系数较小。其中,英国和法国两群体间遗传分化系数最小,西班牙和法国群体

间的遗传分化系数最大。

2.5.2 三群体间遗传相似系数和遗传距离 Nei(1978)遗传相似系数和无偏遗传距离见表 6,通过此矩阵可以看出大菱鲂 3 个群体之间的遗传距离较小,其中英国和法国群体间的遗传距离最小,相似性系数最高;西班牙和法国群体的遗传距离最大。此结果与遗传分化系数 G_{st} 和 Φ_{st} 相一致。

表 5 大菱鲂 3 个群体间的遗传分化系数

Tab.5 Genetic diversity index among three populations of *S. maximus*

群体	Nei 遗传分化系数 G_{st}			AMOVA 遗传分化系数 Φ_{st}		
	S	F	E	S	F	E
S	—	0.0710	0.0531	—	0.03139	0.02953
F	0.0673	—	0.0432	0.01316	—	0.01896
E	0.0360	0.0332	—	0.01053	0.00789	—

注:对角线以下为 RAPD 分析得出的数值,对角线以上为微卫星分析得出的数值

表 6 大菱鲂 3 个群体间的 Nei 遗传相似度和遗传距离

Tab.6 Genetic similarity and genetic distance among three populations of *S. maximus*

群体	RAPD 数据			微卫星数据		
	S	F	E	S	F	E
S	—	0.9810	0.9870	—	0.8864	0.8970
F	0.0192	—	0.9877	0.1205	—	0.9341
E	0.0131	0.0124	—	0.1087	0.0682	—

注:对角线以下为遗传距离 (D), 对角线以上为遗传相似度 (I)

2.5.3 AMOVA 分析群体遗传变异来源 用 AMOVA 进行遗传变异方差分析,将三个群体分为一组,分别计算群体内和群体间变异对总遗传变异 σ^2 的贡献率(表 7)。RAPD 和 SSR 分析分别揭

示有 98.95%、97.35% 的变异来自于群体内个体间。 Φ_{st} 值显著性检验表明:群体间的变异对总遗传变异影响不显著。

表 7 大菱鲂群体的 AMOVA 分析数据

Tab.7 Data derived from AMOVA of *S. maximus* populations

分析方法	变异来源	自由度 (df)	方差总和 (SSD)	变异组分 (V_a)	变异贡献率 (%)	Φ_{st}
RAPD	群体间	2	1.947	0.00526	1.05	0.01053
	群体内	57	28.200	0.49474	98.95	—
	总和	59	29.400	0.50000	—	—
SSR	群体间	2	4.300	0.03789	2.65	0.02650
	群体内	57	79.350	1.39211	97.35	—
	总和	59	83.650	1.43000	—	—

3 讨论

3.1 大菱鲂群体的遗传结构

大菱鲂的遗传多样性,是海水养殖界共同关注的问题之一。同工酶、RAPD 以及微卫星 (Iyengar *et al.*, 1999, 2000) 等技术均已被应用于其遗传多样性的研究。Blanquer 等 (1992) 利用同工酶电泳技术研究了覆盖全部大菱鲂分布范围的 11 个不同地理群体的遗传结构, 13 种同工酶的 17 个位点的研究结果显示: 只有爱琴海的大菱鲂在 *Idh-2* 位点上出现多态性, 但其与不同的地理种群的大菱鲂群体的遗传距离却非常小, 仅为 $0.002 < D < 0.003$, 不同地理种群的野生大菱鲂群体的生化遗传变异水平非常低。Coughlan 等 (1996) 从大菱鲂基因组中分离到 4 个微卫星位点 *Smax-1*、*Smax-2*、*Smax-3*、*Smax-4*, 1998 年 Coughlan 等利用等位基因数目丰富的 *Smax-1*、*Smax-2* 和 *Smax-4* 三个位点分析爱尔兰、挪威的野生和养殖大菱鲂群体遗传多样性, 结果表明: 野生群体间遗传差异很小, 几乎没有地理分化。据 Blanquer 等 (1992)、Bouza 等 (1997) 和 Coughlan 等 (1998) 的研究报道, 野生大菱鲂群体遗传多样性低可能有以下几方面的原因: (1) 大菱鲂整个分布范围内种质来源单一, 推测为冰期后从单一的避难处分散开 (例如: 地中海群体为来自于大西洋冰河期后的近代大菱鲂自南向北迅速扩散定居所致)。(2) 群体间存在基因交流 (大菱鲂在浮游阶段持续的基因流动)。(3) 由于气候条件的恶化, 大菱鲂数量迅速大量减少, 产生瓶颈效应 (Nei *et al.*, 1975)。

邹曙明等 (2001) 对乳山养殖场从英国引进大菱鲂人工繁殖的第一代进行 RAPD 分析, 结果表明: 个体间遗传相似度 $F = 0.945$, 遗传距离 $D =$

0.045, 说明了我国引进的大菱鲂遗传多样性水平低, 并建议要重视近交衰退问题。

本实验中利用微卫星和 RAPD 两种分子标记技术分析中国进口 3 个大菱鲂群体的遗传多样性。实验结果表明: 西班牙群体遗传多样性水平最高, 英国群体次之, 而法国群体最低。但总体上, 由 Shannon 多样性指数 H 、Nei 基因多样性指数 H_0 (Nei, 1978) 以及平均杂合度 H_e 等几种基因多样性指数分析均得出三个进口大菱鲂群体的遗传多样性均较低, 群体内个体间的遗传变异非常小, 有些个体间的遗传相似度很高, 达到 1.000, 亲缘关系很近。这一结果与邹曙明等 (2001) 得出的实验结论一致。基于 Nei 分析 (Nei, 1973) 和基于 AMOVA 分析的遗传分化系数 G_{st} 和 Φ_{st} 都表明群体间的遗传分化很弱。利用 Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数估算群体遗传变异的来源, 两者得出一致的结论: 群体间遗传分化很弱。同时 AMOVA 分析结果验证了 Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数对遗传变异来源的分析结果: 总群体的遗传变异有 97% 以上是由群体内个体间的遗传变异引起的, 即遗传变异主要来自于群体内个体间, 显著性检验表明群体间的遗传变异对总遗传变异的影响不显著。以上实验结果充分证明我国进口大菱鲂群体内遗传多样性水平低, 群体间遗传分化很弱。

3.2 我国进口大菱鲂群体遗传多样性低的原因

杂合度又称基因多样性, 反映各群体在 n 个座位上的遗传变异, 一般认为它是度量群体遗传变异的一个最适参数 (牛荣等, 2001)。Coughlan 等 (1998) 用 3 个微卫星座位研究爱尔兰、挪威野

生和养殖大菱鲆群体遗传多样性,得出各群体平均杂合度分别为:爱尔兰野生群体 0.66 ± 0.08 , 养殖群体 0.66 ± 0.05 ;挪威野生群体 0.71 ± 0.08 , 养殖群体 0.68 ± 0.06 。本实验中用 4 个微卫星座位测得的 3 群体平均杂合度分别为 0.4822、0.3019、0.4719, 显著低于 Coughlan 等(1998)的实验结果。

从各群体的等位基因组成可以评价其遗传背景(牛荣等, 2001)。本实验中 4 个微卫星座位在 3 个群体中共检测到 18 个等位基因, 平均每个座位为 4.5 个, 等位基因最多的为座位 B18-II CA70, 共发现 9 个等位基因, 其他三个座位等位基因数目很少, 法国群体在 Smax-04 位点上仅有一个等位基因(即这一群体所有个体均为同一基因纯合), 远远少于 Coughlan 等(1998)所测得的等位基因数目, 说明我国引进的大菱鲆群体丢失了大量的等位基因。而平均杂合度的下降、等位基因的大量丢失与长期人工繁育及近交有着十分直接和密切的关系(牛荣等, 2001)。

根据本实验结果结合已有的研究报道推测我国进口大菱鲆群体遗传多样性水平低的原因可能是:目前, 欧洲是世界上最大的大菱鲆生产基地, 其中法国大菱鲆公司是大菱鲆苗种最大的生产企业, 欧洲大多数大菱鲆养殖企业(西班牙、英国、葡萄牙、丹麦等)均用该公司生产的苗种(杜佳垠, 2001), 所以欧洲主要养殖地区的大菱鲆大多是间接引进的, 引进的群体数量一般较小, 在商业化生产中, 由于野生大菱鲆群体本身的遗传多样性较低, 而且几乎没有地理分化(即进行大规模商业化生产的大菱鲆的基础群遗传多样性本身就很低), 在长期的人工繁育过程中就不可避免的会产生近交现象, 群体中不断淘汰不利基因, 纯化有利基因, 使群体基因型趋于一致和纯合, 从而导致了遗传基因多样性的水平越来越低, 使我国进口的大菱鲆群体内遗传多样性水平低。目前, 我国主要从英国、法国、丹麦等国进口大菱鲆苗种进行养成和繁殖(杜佳垠, 2001), 引进的大菱鲆苗种来自 10 多个国家, 表面看来非常广泛, 但是对这些苗种均未做遗传背景分析, 很可能都是来自同一个地理分布区, 所以我国进口的大菱鲆群体间遗传分化表现很弱。

3.3 我国进口大菱鲆种质资源的有效开发与利用

我国自 1999 年突破大菱鲆连续大批量苗种生产技术以来, 育苗产量连年大幅度上升, 至

2003 年全国年产量已达 1000 万尾(雷霖, 2000; 2002a, b), 但是由于对引进的原种和国内选留的繁殖群体均未进行过任何遗传背景的考察和分析, 每年只是依靠简单的传统方法选择育种, 所以对我国目前大菱鲆种质处于何种状态依然是一个未知数, 近亲交配的结果不可避免地会导致孵化率低、成活率低、生长速度慢、白化严重等系列种质退化现象的不断发生。

为保证我国大菱鲆养殖产业持续、健康、稳定的发展, 今后, 既要注重引进苗种的种质控制, 更要加强我国现有大菱鲆种质资源的调查研究, 制定切实可行的利用方案, 采取科学的选种育种方法。只有运用传统的遗传育种技术与现代生物技术相结合培育出优质、健康、抗逆性强的新品种, 才有可能确保大菱鲆这一优良种质在我国得到持续利用。

参 考 文 献

- 马爱军、雷霖、陈四清等, 2002. 大菱鲆不同产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响. 海洋与湖沼, 33(1):75—82
- 尤 锋、王可玲、相建海等, 1999. 山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼, 30(2): 127—134
- 牛 荣、商海涛、魏 泓等, 2001. 版纳小耳猪近交系 5 个家系 35 个微卫星位点的遗传分析. 遗传学报, 28(6): 56—62
- 朱 杰、张秀梅、高天翔等, 2002. 大菱鲆早期变态发育和体表黑色素细胞形态学观察. 水产学报, 26(3): 193—200
- 杜佳垠, 2001. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 养殖现状. 现代渔业信息, 16(2):16—21
- 李星云、赵明忠、钟爱华等, 2003. 山东日照和福建厦门沿海花鲈遗传多样性的 RAPD 研究. 海洋与湖沼, 34(6):618—624
- 邹曙明、李思发、蔡完其等, 2001. 牙鲆和大菱鲆养殖群体的分子标记和遗传变异. 中国水产科学, 7(4): 25—38
- 雷霖, 2000. 海水养殖新品种介绍——大菱鲆. 中国水产, 4: 89—92
- 雷霖, 2002a. 关于当前我国北方沿海工厂化养鱼的一些问题和建议. 现代渔业信息, 17(4): 5—8
- 雷霖, 2002b. 关于引进海水养殖鱼类的问题和建议. 中国水产, 2: 47—51
- 雷霖, 马爱军, 刘新富等, 2003. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 胚胎及仔稚幼鱼发育研究. 海洋与湖沼, 34(1):9—18

- Blanquer A, Alayse J P, 1992. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, pleuonectonformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. *J Fish Biol*, 41: 725—736
- Bouza C, Sanchez L, Martinez P, 1997. Gene diversity analysis in natural populations and cultured stocks of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Anim Genet*, 28: 28—36
- Coughlan J P, McCarthy E, McGregor D *et al.*, 1996. Four polymorphic microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Anim Genet*, 27: 43—442
- Coughlan J P, Imsland A K, Galvin P T *et al.*, 1998. Microsatellites DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *J Fish Biol*, 52: 916—922
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, Heipel D A *et al.*, 1999. A suit of highly polymorphic microsatellites markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) with potential for use across several flatfish species. *Molecular Ecology*, 9: 365—378
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, David M Stone *et al.*, 2000. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover sole (*Solea solea*) using a RAPD-Rased technique: characterization of microsatellite markers in Dover sole and Dover. *Mar Biotechnol*, 2: 49—56
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 3321—3323
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583—590
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1—10

POPULATION GENETIC STRUCTURE ANALYSIS OF THE IMPORTED TURBOT SEEDLINGS *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L. USING RAPD AND MICROSATELLITE TECHNIQUE

SHEN Xue-Yan, GONG Qing-Li[†], LEI Ji-Lin^{**}, KONG Jie^{**}, ZHAI Jie-Ming^{**}, LI Bo^{***}

(College of Marine Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003; Key Lab of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

[†](College of Marine Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

^{**}(Key Lab of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

^{***}(Laizhou Mingbo Aquatic Products Co., Ltd., Laizhou, 261400)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) molecular markers were used to detect genetic diversity, genetic structure and genetic divergency among three populations of *Scophthalmus maximus* L. imported from England, France and Spain (June 2002). Genetic DNA was extracted from muscle of the 60 *S. maximus* L. Inter-stock genetic similarity and intra-stock genetic similarity was then analyzed. Thirty random primers were used for analysis of nuclear DNA polymorphism of the three populations. Results showed that twenty primers were effective. 20 RAPD primers together produced 125 reproducible bands ranging from 200bp to 2500bp. The mean percentage of polymorphic loci of the three populations ranged from 12.80%—20.00%, while Nei's gene diversity was between 0.0142 and 0.0352. The average Shannon's indices of population phenotype ranged from 0.0423 to 0.0720. All these polymorphic indices revealed genetic diversity between the populations differing from each other. Shannon indices suggested that differentiation of *S. maximus* L. were divided into two parts, 1.05% from inter-populations and 98.95% from intra-populations. Hierarchy analysis of the population verified Shannon indices, 98.81% of the variance was from intra-populations. Concurrently, results of Analysis of Molecular Variation (AMOVA) revealed that the variance of inter-population hadn't significantly affected the total variance of *S. maximus* L. AMOVA (Analysis of Molecular Variation) analysis verified Shannon indices and Nei's gene diversity, over 97% of the variance was from intra-populations. At the same time, results of AMOVA revealed that the variance of inter-populations did not affect the total variance of *S. maximus* L. Results of SSR analysis including

mean percentage of polymorphic loci, Nei's gene diversity and average Shannon's indices of phenotypic were all consistent with the results of RAPD revealing low genetic diversity of *S. maximus* L. populations. The lowest genetic diversity was in French population while the highest was in Spanish. Genetic distance of the three populations by RAPD analysis was 0.0124 to 0.0192 consistent with results of SSR. By comparing the results of RAPD and those of SSR, SSR was found to be more sensitive than RAPD in revealing polymorphism. SSR can reflect a higher level of genetic diversity than RAPD. In terms genetic similarity and distance, differences were seen between the results obtained from each method. Genetic diversity revealed by SSR was higher than that obtained by RAPD. As a whole, the results for population genetic structure detected by RAPD and SSR were consistent, yet a slight difference appeared with in intra-population genetic diversity, mainly due to differences in genetic variance detection abilities of the two techniques. All results here suggest that genetic diversity of imported turbot populations was very low. Thus, measures must be taken to avoid inbreeding depression of *S. maximus* L. in domestic populations in China.

Key words Turbot *Scophthalmus maximus* L., Population, RAPD, SSR. Genetic diversity

征集《海洋与湖沼》封面彩色图片

为了使《海洋与湖沼》期刊封面能更好地与国际期刊接轨,又能体现出其学科特色,起到美化封面的效果,自 2004 年第 1 期开始,拟定每期更换一个彩色封面图片,故向广大海洋湖沼科技工作者组约附有较高学术价值的质优彩色图版的稿件,一旦选用,稿件优先发表。欢迎积极投稿。

来稿请寄:青岛市南海路 7 号《海洋与湖沼》编辑部收

E-mail: pychen@ms.qdio.ac.cn 电话:0532:2898753