

多鳞鱻(*Sillago sihama*)4 个野生地理群体的微卫星标记分析*

郭昱嵩 颜程钟 张宇岚 郑近楠 许远民
杜涛 王中铎 刘楚吾

(广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室 湛江 524088)

摘要 采用微卫星 DNA 分子标记方法对中国南部沿海多鳞鱻(*Sillago sihama*)广西北海、广东湛江、汕尾及海南三亚 4 个野生地理群体进行了遗传多样性及遗传分化等研究。结果表明: (1) 用于研究的 34 对微卫星引物在 4 个群体中具有丰富的多态性, 有效等位基因数介于 1.71—20.46 之间, 多态信息含量 PIC 介于 0.40—0.95 之间。4 个群体总的平均期望杂合度(H_e)为 0.598, 观测杂合度(H_o)为 0.572, SY 群体的杂合度最大($H_e=0.606$, $H_o=0.623$), SW 群体的最小($H_e=0.586$, $H_o=0.508$)。 (2) 群体间 F -统计量分析表明, 群体遗传分化处于高度分化水平(F_{st} 平均值为 0.306); 基于奈氏遗传距离(D_A)构建的 NJ 和 UPGMA 聚类树均显示地理位置相邻的群体聚在一起。

关键词 多鳞鱻; 微卫星 DNA; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号 Q953

多鳞鱻(*Sillago sihama* Forsskål, 1775), 属鲈形目(Perciformes)、鱻科(Sillaginidae)、鱻属(*Sillago*)鱼类, 分布于红海、印度洋和太平洋, 中国沿海海域均有分布(Wantiez, 1993)。成鱼栖散于沿海近岸、沙洲、红树林、河口等处, 经常钻入沙中(McKay, 1992), 因此俗称沙尖鱼、沙丁鱼、沙钻、麦穗。其肉质鲜美, 既是经济性食用鱼又是著名的沙岸游钓鱼种。由于近年来的过度捕捞及沿海资源的破坏, 自然资源已面临枯竭的危险。为恢复多鳞鱻资源, 现已开展多鳞鱻的室内养殖试验(杜涛等, 2009)。开展多鳞鱻人工繁育与养殖, 对保护现有的多鳞鱻资源及可持续性利用具有积极的意义, 但也容易造成养殖群体与野生群体的遗传渐渗或遗传稀释。因此, 为了达到保护多鳞鱻遗传资源、保证资源可持续发展的目的, 应在开展人工繁育之前对多鳞鱻的遗传多样性进行研究。目前, 国内外关于多鳞鱻的研究主要集中在生理学(Lee *et al.*,

1981; 卢振彬等, 2008)、早期发育形态(万瑞景, 1996)、物种分类鉴定(潘晓哲等, 2010)与系统进化关系上(Gao *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012)。关于多鳞鱻等鱻属鱼类的群体遗传多样性研究还未见报道。

微卫星 DNA(microsatellite DNA), 又称简单序列重复(SSR, simple sequence repeat), 是 1—6 个碱基串联重复序列。水产动物微卫星 DNA 标记的开发和使用较晚, 但发展较快。目前, 微卫星 DNA 标记已被运用到金头鲷(*Sparus aurata*)(Alarcóna *et al.*, 2004)、欧洲鳊(*Engraulis encrasicolus*)(Zarraonaindia *et al.*, 2009)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(王蕾等, 2010)等水产经济鱼类的野生地理群体中进行遗传多样性分析。本研究通过微卫星标记分析中国南部沿海多鳞鱻野生群体的遗传多样性, 探讨群体的遗传结构及亲缘关系, 以为多鳞鱻种质资源保护、合理利用以及将来人工繁育过程中的良种选育提供理论参考。

* 国家自然科学基金资助, 31101904 号, 31201996 号; 广东省科技计划项目资助, 2010A020307001-84 号; 广东省大学生创新实验项目, 1056610003 号。郭昱嵩, 博士, E-mail: gysrabbit@163.com

通讯作者: 刘楚吾, 教授, E-mail: liucw5206@163.com

收稿日期: 2012-04-24, 收修改稿日期: 2012-06-29

1 材料与方 法

1.1 样本采集与 DNA 提取

野生多鳞鱮样本于 2009 年 4—10 月采自广西北海(BH)、广东湛江(ZJ)、广东汕尾(SW)与海南三亚(SY)的近海。每个群体的样本数为 25 尾。取新鲜肌肉用于 DNA 的提取。总 DNA 的制备参考《分子克隆》(Sambrook *et al.*, 1989)的方法, 经 0.7%的琼脂糖凝胶电泳检测纯度后于 4℃保存备用。

1.2 PCR 扩增

本研究采用的 34 对多鳞鱮微卫星引物为本项目组开发(Guo *et al.*, 2012), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。PCR 扩增反应体系为: 总体积 10 μ l, 含 1 μ l 10 \times PCR Buffers (含 Mg²⁺), dNTPs 0.2mmol/L, 引物各 0.5 μ mol/L, Takara TaqTM 聚合酶 1U, 总 DNA 约 10ng。

PCR 反应条件如下: 94℃热变性 80s; 94℃变性 30s、退火温度退火 30s、72℃延伸 45s, 30 个循环; 最后 72℃延伸 5min。以 20bp DNA Ladder Marker (Takara) 为标准分子量参照, PCR 扩增产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 3—4h, 银染, 凝胶成像仪检测并拍照。

1.3 数据统计与分析

根据条带的位置利用 Gel-pro 4 analyzer 软件确定基因型, 利用 GenAlex 6 (Peakall *et al.*, 2006)进行群体遗传分析, 计算等位基因数(N)、有效等位基因(N_e)、等位基因频率(P_i), 采用 Bonferroni(1935)方法校正的显著性标准, 进行 H-W 平衡²检验的概率值(P)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)计算。用 Botstein 等(1980)的公式计算微卫星位点多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。利用 ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005)计算总群体近交系数(F_{it})、群体内近交系数(F_{is})、群体遗传分化系数(F_{st})及基因流(N_m)等。利用 DISPAN 计算群体间 Nei's 遗传距离(Genetic distance, D_A)(Nei *et al.*, 1983), 基于 D_A 分别构建 NJ 和 UPGMA 系统树。

2 结果

2.1 遗传多样性分析

34 对微卫星引物在多鳞鱮 4 个野生地理群体中均能够很好地扩增。各位点等位基因数及遗传多样性指数见表 2, 北海(BH)和三亚(SY)群体有一个位点(Ssi 20)呈现群体内单态, 汕尾(SW)群体有 2 个位点(Ssi 20、 Ssi 54)呈现群体内单态, 湛江(ZJ)群体有 2 个位点(Ssi

20、 Ssi 23)呈现群体内单态, 无群体间单态位点。等位基因数介于 4—30 之间, 有效等位基因数介于 1.71—20.46 之间, 多态信息含量 PIC 介于 0.40—0.95 之间。

多鳞鱮 4 个野生地理群体的遗传多样性指数(表 3), 平均等位基因数差别较小, 从大到小依次是 SY ($N=5.97$)、ZJ ($N=5.53$)、BH ($N=5.38$)和 SW ($N=5.35$), 总的平均等位基因数为 5.56; SY 群体的平均期望杂合度($H_e=0.606$)和观测杂合度($H_o=0.623$)最大, SW 群体的最小($H_e=0.586$, $H_o=0.508$), 4 个群体总的平均期望杂合度($H_e=0.598$)和观测杂合度($H_o=0.572$)。结果显示, 三亚群体的遗传多样性在 4 个群体中最高, 而汕尾群体的最低。

利用 Hardy-Weinberg 定律对 4 个群体中每个位点基因平衡状态进行检测(表 3), 显著性标准经 Bonferroni 校正($P<0.0015$)后, BH 群体有 7 个微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 分别是 Ssi 3、 Ssi 7、 Ssi 40、 Ssi 54、 Ssi 57、 Ssi 59 和 Ssi 60; SY 群体有 7 个微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 分别是 Ssi 3、 Ssi 6、 Ssi 7、 Ssi 17、 Ssi 40、 Ssi 42 和 Ssi 61; ZJ 群体有 10 个微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 分别是 Ssi 6、 Ssi 7、 Ssi 17、 Ssi 27、 Ssi 35、 Ssi 42、 Ssi 49、 Ssi 54、 Ssi 57 和 Ssi 58; SW 群体有 12 个微卫星位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 分别是 Ssi 1、 Ssi 2、 Ssi 6、 Ssi 17、 Ssi 18、 Ssi 24、 Ssi 42、 Ssi 49、 Ssi 55、 Ssi 54、 Ssi 57 和 Ssi 61。未发现在 4 个群体中均显著偏离的位点。

2.2 群体遗传分化

2.2.1 固定指数与基因流 由表 4 可见, 本研究的群体内近交系数 F_{is} 值在 -0.738—0.498 之间, 平均值为 0.032; 总群体近交系数 F_{it} 值在 -0.030—0.883 之间, 平均值为 0.334; 各位点的遗传固定指数 F_{st} 值在 0.096—0.766 之间, 平均值为 0.306。各位点的基因流 N_m 在 0.076—2.351 之间, 平均值为 0.881。

2.2.2 群体间遗传距离 基于在 34 个微卫星座位的等位基因频率计算多鳞鱮各野生地理群体间的 Nei's 遗传距离(表 5), 湛江和北海群体遗传距离最近($D_A=0.707$), 三亚和汕尾群体的遗传距离最远($D_A=0.855$); 4 个群体间平均的遗传固定指数(F_{st})如表 5 所示, 湛江与北海群体的遗传固定指数最小($F_{st}=0.208$), 三亚和汕尾群体最大($F_{st}=0.265$)。

基于 D_A 遗传距离, 用 NJ 和 UPGMA 法构建的聚类图结果一致(图 1, 仅列 UPGMA 图), 都支持地理位置最近的湛江与北海群体聚在一起, 再与较近的三

表 1 多鳞鱈微卫星引物序列
Tab.1 Sequences of microsatellite primer pairs for *S. sihama*

位点	引物序列(5'—3')	退火温度 T_a (°C)	重复单元
<i>Ssi</i> 1	F: ACTCAGGCTATGAAAACAAA R: TGATTCATCAAGTAAAGGAG	49	(tg) ₁₆
<i>Ssi</i> 2	F: TGTTGGTTTCCTGGTGG R: ATGACAAGGGCCGTTGAG	51	(ca) ₁₇ N(ac) ₅
<i>Ssi</i> 3	F: TTAGGACAATTCATGGTGGAT R: TCAGGCGGATATGGAGCT	52	(gt) ₆
<i>Ssi</i> 5	F: TGCCGCGGTTGTAATCT R: TGCGAGGGAGCAAAGGAC	52	(ca) ₁₈
<i>Ssi</i> 6	F: TCATCGTCACTGGTCCTT R: CAGCCACTGGAGACTAAA	49	(ac) ₁₇
<i>Ssi</i> 7	F: GAAAGCCATCACATCCTAAT R: CAACAACACTGCTCCCAAAA	50	(tg) ₁₇ N ₁₅ (tg) ₅
<i>Ssi</i> 9	F: AGTGTCTGGAGCTAAGTGAT R: TGTCTGATGTTTATGTGGGT	49	(ca) ₅ N ₂ (ca) ₁₅
<i>Ssi</i> 14	F: CTTTGGAGGGAAGTTGGG R: CATGATGGACGTTATTGTA	51	(ca) ₁₇
<i>Ssi</i> 15	F: ACGTGGGTAATCCACATACA R: GAGGCAGAAACTGAAGAAAA	53	(ca) ₅ N ₃ (ac) ₆ N ₂ (ac) ₇ N ₂ (ac) ₄
<i>Ssi</i> 16	F: ATGCTGTCTCATTCTAAAG R: TGAATAAATGGTTACTGT	50	(ac) ₁₁ (gcacac) ₂ N ₅ (ca) ₉
<i>Ssi</i> 17	F: CCCGCATCTGTATTAGCA R: TCAAACGCAAGCCTATGT	53	(ca) ₈ N(ac) ₃₇
<i>Ssi</i> 18	F: TTCTTCCCACAGCCTCAC R: CTTTATTACTGCGATGC	52	(ca) ₅ N ₃₆ (ac) ₁₆
<i>Ssi</i> 20	F: TCACCCATGAAGGGTTTG R: GCTGTCAGGAGATGTCGC	55	(ca) ₅
<i>Ssi</i> 23	F: GAGATTCAGTCAGCGGGATT R: TGTCAGGTGGCGGGTTTA	58	(ca) ₁₅ N ₈ (ca) ₇
<i>Ssi</i> 24	F: TGCTCGGCATCTCCCTCT R: TCGCTCAGCCTGAACAAT	55	(ac) ₁₆
<i>Ssi</i> 25	F: AAGCCTGCACTTATTGTTC R: CTCCCTCCTTCATCCATT	53	(ca) ₉ N ₅ (ac) ₉
<i>Ssi</i> 27	F: CCAAGCAAGAAGGAAAAC R: CAATCAGGGCCTGCAAAG	53	(ca) ₁₁
<i>Ssi</i> 35	F: CATGGTACGGGTGATGAAGA R: AGGCTGGGACACGGTGAAGT	56	(tg) ₇ N ₂ (tg) ₅ N ₄ (ga) ₃ N(ag) ₄ (ac) ₈
<i>Ssi</i> 37	F: CATTACAGATTTTCTCTTGC R: GACACTCTGGAGCCTAGCAG	52	(tg) ₉ N(gt) ₈ N(tg) ₅
<i>Ssi</i> 40	F: TCCCTTCCACTTGTTCCTC R: CCCACTCAGATGTTTCCACC	58	(ac) ₈ N ₁₅ (ca) ₅
<i>Ssi</i> 42	F: TGTCTCCATTAGCCAAAGTG R: GGAGGGAAAAGAGGTCAAAA	56	(ac) ₈
<i>Ssi</i> 44	F: ATCCCGCCTTTGTTGGTTCA R: TTCTGCTGCTTGCTGTGAAT	55	(ac) ₇
<i>Ssi</i> 45	F: AAGATGAAAACCAGGGAGCA R: ATGTCGCACTCAGGGTAAA	57	(ca) ₅ N ₂ (ca) ₃
<i>Ssi</i> 49	F: AGCCTGTATTTAGTACCCTC R: GATCCAGCACGAACCTTCTC	56	(at) ₅
<i>Ssi</i> 54	F: GGTTGGATCTGGTTTGTG R: GTGTCGGTTTGACGTTGC	51	(ca) ₆
<i>Ssi</i> 55	F: CTGGGCTGTAACGTAATG R: GAAACTTTGACCTTCTCCC	50	(ca) ₇
<i>Ssi</i> 56	F: CCTTGAACATAATTGTCTC R: AATATTCTGCTTACACTCT	50	(ca) ₆ N(ac) ₅
<i>Ssi</i> 57	F: TTTCACGGCTGGAGGAGG R: GTGCGGTTGAGGGACGA	57	c ₇ N ₃ c ₈ N ₈ (ca) ₆
<i>Ssi</i> 58	F: TAGAAATCAAAGAAATGCCACG R: GACCGAGTAACGAATACAACCA	49	(ca) ₆
<i>Ssi</i> 59	F: AGCCTGGATTTCTGGGTT R: AGCGTCTTGGCATGTCTG	57	(ca) ₆ N ₂ (ca) ₁₁
<i>Ssi</i> 60	F: TACTTCTCATTAGAGCCACG R: TGCGAGCTTGATGTTGTA	52	(ga) ₉ N ₁₂ (ac) ₂₉ N ₂ (ag) ₆
<i>Ssi</i> 61	F: TGGAGGTTGCTCGGTGTC R: ATTTGGATTTCTTGGTGC	51	(ca) ₁₀
<i>Ssi</i> 62	F: ACTGACCTGCTCAATGACT R: CTTGGCACTGGCACTTCT	53	(ac) ₁₀
<i>Ssi</i> 63	F: GCTGGAACGAAAGCGAAAA R: GCAAACCGCCACTGATGT	52	(ca) ₈ N ₄ (ac) ₆

表 2 多鳞鱈 34 个微卫星位点有效等位基因数、杂合度及多态信息含量
Tab.2 Statistic number of effective alleles, heterozygosity and polymorphism information content of 34 microsatellite loci for *S. sihama*

位点	等位基因数 N	有效等位基因数 N_e	期望杂合度 H_e	观测杂合度 H_o	多态信息含量 PIC
<i>Ssi</i> 1	21	11.06	0.910	0.760	0.90
<i>Ssi</i> 35	25	10.43	0.904	0.849	0.90
<i>Ssi</i> 14	26	16.11	0.938	0.798	0.93
<i>Ssi</i> 15	19	10.26	0.902	0.637	0.89
<i>Ssi</i> 61	23	12.93	0.923	0.578	0.92
<i>Ssi</i> 63	11	6.59	0.848	0.700	0.83
<i>Ssi</i> 56	15	7.80	0.872	0.495	0.86
<i>Ssi</i> 57	11	4.21	0.763	0.380	0.73
<i>Ssi</i> 60	22	18.02	0.945	0.903	0.94
<i>Ssi</i> 17	20	13.10	0.924	0.773	0.92
<i>Ssi</i> 2	23	13.67	0.927	0.796	0.92
<i>Ssi</i> 3	7	4.22	0.763	0.535	0.73
<i>Ssi</i> 18	21	9.41	0.894	0.709	0.89
<i>Ssi</i> 5	17	9.26	0.892	0.449	0.88
<i>Ssi</i> 9	16	8.07	0.876	0.598	0.86
<i>Ssi</i> 23	24	7.12	0.859	0.425	0.85
<i>Ssi</i> 37	21	10.10	0.901	0.663	0.89
<i>Ssi</i> 27	14	6.82	0.853	0.606	0.84
<i>Ssi</i> 40	10	2.88	0.653	0.381	0.63
<i>Ssi</i> 44	8	1.71	0.414	0.313	0.40
<i>Ssi</i> 45	5	3.75	0.733	0.442	0.69
<i>Ssi</i> 49	10	2.07	0.516	0.229	0.49
<i>Ssi</i> 62	14	7.35	0.864	0.616	0.85
<i>Ssi</i> 54	7	4.91	0.796	0.092	0.77
<i>Ssi</i> 55	9	4.88	0.795	0.557	0.77
<i>Ssi</i> 16	25	10.50	0.905	0.474	0.90
<i>Ssi</i> 58	12	5.88	0.830	0.586	0.81
<i>Ssi</i> 59	15	9.54	0.895	0.811	0.89
<i>Ssi</i> 6	20	8.83	0.887	0.462	0.88
<i>Ssi</i> 7	30	20.46	0.951	0.606	0.95
<i>Ssi</i> 20	4	4.00	0.750	0.000	0.70
<i>Ssi</i> 24	14	9.92	0.899	0.595	0.89
<i>Ssi</i> 25	19	10.84	0.908	0.558	0.90
<i>Ssi</i> 42	13	6.08	0.836	0.859	0.82

表 3 4 个多鳞鱈野生群体微卫星遗传多样性参数
Tab.3 Genetic diversity indices in four wild populations of *S. sihama*

位点	指数	群体			
		北海(BH)	湛江(ZJ)	汕尾(SW)	三亚(SY)
<i>Ssi</i> 1	N	7	7	6	15
	P	0.011	0.004	0.000*	0.877
	H_e	0.824	0.814	0.665	0.893
	H_o	0.960	0.840	0.320	0.920
<i>Ssi</i> 35	N	12	5	3	12

续表 3

位点	指数	群体			
		北海(BH)	湛江(ZJ)	汕尾(SW)	三亚(SY)
Ssi 14	<i>P</i>	0.447	0.000*	0.085	0.379
	<i>H_c</i>	0.886	0.684	0.482	0.882
	<i>H_o</i>	0.958	1.000	0.680	0.818
	<i>N</i>	8	5	11	10
	<i>P</i>	0.471	0.039	0.030	0.156
Ssi 15	<i>H_c</i>	0.796	0.715	0.886	0.880
	<i>H_o</i>	0.783	0.560	0.913	0.957
	<i>N</i>	8	9	9	3
	<i>P</i>	0.007	0.552	0.044	0.198
	<i>H_c</i>	0.839	0.831	0.865	0.460
Ssi 61	<i>H_o</i>	0.640	0.880	0.619	0.350
	<i>N</i>	7	10	10	7
	<i>P</i>	0.191	0.457	0.000*	0.000*
	<i>H_c</i>	0.804	0.871	0.813	0.664
	<i>H_o</i>	0.682	0.920	0.632	0.083
Ssi 63	<i>N</i>	7	6	5	3
	<i>P</i>	0.304	0.152	0.023	0.864
	<i>H_c</i>	0.776	0.757	0.759	0.328
	<i>H_o</i>	0.708	0.826	0.750	0.385
	<i>N</i>	2	5	7	2
Ssi 56	<i>P</i>	0.484	0.011	0.201	0.922
	<i>H_c</i>	0.219	0.766	0.801	0.449
	<i>H_o</i>	0.250	0.625	0.682	0.440
	<i>N</i>	3	4	4	3
	<i>P</i>	0.000*	0.000*	0.001*	0.286
Ssi 57	<i>H_c</i>	0.114	0.253	0.626	0.422
	<i>H_o</i>	0.080	0.160	0.720	0.560
	<i>N</i>	7	10	9	8
	<i>P</i>	0.000*	0.008	0.079	0.007
	<i>H_c</i>	0.842	0.871	0.862	0.840
Ssi 60	<i>H_o</i>	1.000	0.750	0.917	0.950
	<i>N</i>	9	7	7	3
	<i>P</i>	0.257	0.001*	0.000*	0.000*
	<i>H_c</i>	0.839	0.830	0.799	0.555
	<i>H_o</i>	0.960	0.750	0.375	1.000
Ssi 2	<i>N</i>	5	10	10	9
	<i>P</i>	0.033	0.071	0.000*	0.006
	<i>H_c</i>	0.758	0.863	0.842	0.806
	<i>H_o</i>	0.792	0.880	0.920	0.583
	<i>N</i>	2	2	2	2
Ssi 3	<i>P</i>	0.000*	0.750	0.744	0.000*
	<i>H_c</i>	0.493	0.113	0.117	0.500
	<i>H_o</i>	0.880	0.120	0.125	1.000
	<i>N</i>	7	9	5	8
	<i>Ssi 18</i>	<i>N</i>	7	9	5

续表 3

位点	指数	群体			
		北海(BH)	湛江(ZJ)	汕尾(SW)	三亚(SY)
Ssi 5	P	0.227	0.357	0.000*	0.236
	H_c	0.778	0.785	0.834	0.806
	H_o	0.692	0.957	0.440	0.778
	N	2	7	5	4
Ssi 9	P	0.416	0.105	0.007	0.267
	H_c	0.241	0.754	0.754	0.566
	H_o	0.280	0.440	0.478	0.600
	N	6	7	3	10
Ssi 23	P	0.001	0.092	0.752	0.176
	H_c	0.754	0.784	0.310	0.833
	H_o	0.560	0.609	0.360	0.875
	N	13	1	3	14
Ssi 37	P	0.710	—	0.025	0.137
	H_c	0.896	0.000	0.455	0.896
	H_o	0.880	0.000	0.280	0.667
	N	7	8	2	7
Ssi 27	P	0.058	0.017	0.648	0.363
	H_c	0.719	0.858	0.159	0.780
	H_o	0.783	0.840	0.174	0.833
	N	6	4	2	9
Ssi 40	P	0.764	0.000*	0.245	0.651
	H_c	0.800	0.706	0.332	0.856
	H_o	1.000	0.318	0.421	0.920
	N	4	4	2	3
Ssi 44	P	0.001*	0.999	0.106	0.000*
	H_c	0.636	0.186	0.187	0.540
	H_o	0.240	0.200	0.125	1.000
	N	5	2	4	2
Ssi 45	P	0.984	0.569	0.095	0.656
	H_c	0.434	0.187	0.685	0.153
	H_o	0.522	0.208	0.444	0.167
	N	2	2	3	2
Ssi 49	P	0.341	0.092	0.364	0.586
	H_c	0.403	0.449	0.346	0.375
	H_o	0.480	0.600	0.238	0.417
	N	2	3	5	2
Ssi 62	P	0.664	0.000*	0.000*	0.484
	H_c	0.147	0.278	0.569	0.219
	H_o	0.160	0.080	0.455	0.250
	N	4	8	3	5
Ssi 54	P	0.418	0.437	0.044	0.003
	H_c	0.583	0.810	0.589	0.729
	H_o	0.409	0.840	0.929	0.400
	N	2	3	1	2
Ssi 54	P	0.750	0.000*	—	0.648
	H_c	0.113	0.473	0.000	0.159
	H_o	0.120	0.080	0.000	0.174

续表 3

位点	指数	群体			
		北海(BH)	湛江(ZJ)	汕尾(SW)	三亚(SY)
Ssi 55	<i>N</i>	2	4	2	2
	<i>P</i>	0.403	0.530	0.000*	0.272
	<i>H_c</i>	0.249	0.601	0.500	0.295
	<i>H_o</i>	0.292	0.565	1.000	0.360
Ssi 16	<i>N</i>	5	8	3	12
	<i>P</i>	0.000*	0.041	0.000*	0.348
	<i>H_c</i>	0.705	0.681	0.322	0.858
	<i>H_o</i>	0.280	0.583	0.208	0.833
Ssi 58	<i>N</i>	2	2	7	4
	<i>P</i>	0.052	0.001*	0.017	0.006
	<i>H_c</i>	0.403	0.478	0.742	0.546
	<i>H_o</i>	0.560	0.792	0.643	0.375
Ssi 59	<i>N</i>	7	9	9	4
	<i>P</i>	0.000*	0.054	0.938	0.007
	<i>H_c</i>	0.816	0.851	0.818	0.551
	<i>H_o</i>	0.870	0.760	0.864	0.760
Ssi 6	<i>N</i>	7	4	6	10
	<i>P</i>	0.392	0.000*	0.000*	0.000*
	<i>H_c</i>	0.789	0.479	0.753	0.798
	<i>H_o</i>	0.762	0.320	0.136	0.652
Ssi 7	<i>N</i>	9	9	11	9
	<i>P</i>	0.000*	0.000*	0.304	0.000*
	<i>H_c</i>	0.821	0.837	0.776	0.846
	<i>H_o</i>	0.960	0.520	0.542	0.400
Ssi 20	<i>N</i>	1	1	1	1
	<i>P</i>	—	—	—	—
	<i>H_c</i>	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>H_o</i>	0.000	0.000	0.000	0.000
Ssi 24	<i>N</i>	7	5	4	5
	<i>P</i>	0.250	0.020	0.000*	0.181
	<i>H_c</i>	0.805	0.739	0.690	0.745
	<i>H_o</i>	0.560	0.500	0.600	0.900
Ssi 25	<i>N</i>	4	5	6	8
	<i>P</i>	0.129	0.479	0.002	0.032
	<i>H_c</i>	0.571	0.650	0.782	0.774
	<i>H_o</i>	0.524	0.636	0.364	0.833
Ssi 42	<i>N</i>	2	3	8	3
	<i>P</i>	0.052	0.000*	0.001*	0.000*
	<i>H_c</i>	0.403	0.554	0.798	0.609
	<i>H_o</i>	0.560	1.000	0.920	0.958
平均	<i>N</i>	5.38	5.97	5.35	5.53
	<i>H_c</i>	0.596	0.606	0.586	0.603
	<i>H_o</i>	0.594	0.623	0.508	0.564

注: 等位基因数(*N*), 观测杂合度(*H_o*), 期望杂合度(*H_c*), 哈温平衡卡平方检测概率值(*P*), *经 Bonferroni 校正后显著偏离 Hardy-Weinberg ($P < 0.0015$)

表 4 多鳞鲢群体各多态位点的 F 值和基因流(N_m)
Tab.4 F value and gene flow (N_m) for all polymorphic loci in each population of *S. sihama*

位点	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
Ssi 1	0.049	0.164	0.122	1.806
Ssi 35	-0.178	0.048	0.191	1.056
Ssi 14	0.020	0.145	0.128	1.709
Ssi 15	0.169	0.307	0.166	1.257
Ssi 61	0.265	0.372	0.145	1.474
Ssi 63	-0.019	0.195	0.210	0.943
Ssi 56	0.106	0.430	0.362	0.440
Ssi 57	-0.073	0.502	0.536	0.217
Ssi 60	-0.059	0.043	0.096	2.351
Ssi 17	-0.020	0.165	0.182	1.127
Ssi 2	0.029	0.143	0.118	1.874
Ssi 3	-0.738	0.302	0.598	0.168
Ssi 18	0.105	0.199	0.105	2.142
Ssi 5	0.223	0.497	0.353	0.459
Ssi 9	0.104	0.316	0.237	0.806
Ssi 23	0.187	0.485	0.366	0.432
Ssi 37	-0.046	0.268	0.300	0.584
Ssi 27	0.013	0.226	0.216	0.906
Ssi 40	-0.011	0.407	0.413	0.355
Ssi 44	0.080	0.405	0.353	0.459
Ssi 45	-0.103	0.414	0.468	0.284
Ssi 49	0.222	0.560	0.435	0.325
Ssi 62	0.049	0.258	0.220	0.888
Ssi 54	0.498	0.883	0.766	0.076
Ssi 55	-0.347	0.301	0.481	0.270
Ssi 16	0.258	0.473	0.291	0.610
Ssi 58	-0.092	0.300	0.359	0.446
Ssi 59	-0.071	0.092	0.153	1.386
Ssi 6	0.337	0.475	0.209	0.946
Ssi 7	0.262	0.363	0.138	1.563
Ssi 24	0.141	0.289	0.173	1.195
Ssi 25	0.151	0.356	0.241	0.788
Ssi 42	-0.454	- 0.030	0.292	0.607
平均值	0.032	0.334	0.306	0.881
S.E	0.040	0.036	0.034	0.106

注: $N_m = [(1/F_{st})-1] / 4$

表 5 多鳞鲢群体间 F -统计量(F_{st} , 对角线下)和遗传距离(D_A , 对角线上)

Tab.5 Pairwise F estimates (F_{st} , below diagonal) and genetic distance (D_A , above diagonal) among populations of *S. sihama*

群体	北海(BH)	三亚(SY)	汕尾(SW)	湛江(ZJ)
BH	—	0.753	0.812	0.707
SY	0.226	—	0.855	0.760
SW	0.257	0.265	—	0.815
ZJ	0.208	0.215	0.246	—

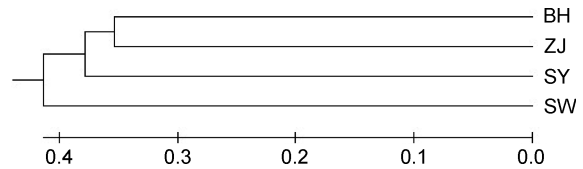


图 1 基于 D_A 遗传距离的 UPGMA 聚类树

Fig.1 UPGMA clustering tree based on D_A genetic distance

亚群体聚为一支, 最后与汕尾群体聚为一支。

3 讨论

根据 Botstein 等(1980)提出的标准, $PIC>0.5$ 属于高度多态性, $0.25<PIC<0.5$ 为中度多态位点, $PIC<0.25$ 为低度多态位点。本研究中 34 个多态位点中, 有 32 个位点为高度多态位点, 2 个为中度多态位点(Ssi 44, Ssi 49)。遗传杂合度(H)是指微卫星座位为杂合子的比例, 能较好地反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度, 其大小可以反映群体遗传变异的高低, 普遍认为杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数。对于底层海水鱼类已有较多的相关研究开展, 如 Haigh 等(2000)对鳢科、长背鳢属的斑似鳢 (*Sillaginodes punctata*) 进行微卫星位点的开发得到 9 个多态性位点, 并对澳大利亚的 10 个地理群体进行分析, 平均 H_e 为 0.550, H_o 为 0.418。Dae 等(2009)开发了 11 对微卫星多态引物对韩国海区竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)进行遗传多样性分析, 揭示其平均 H_e 为 0.81, H_o 为 0.70。Wen 等(2007)开发了 10 对带鱼(*Trichiurus haumela*)微卫星多态引物对其进行遗传多样性分析, 结果显示平均 H_e 为 0.84, H_o 为 0.71。本研究中, 4 个多鳞鲢野生地理群体的平均 H_e 为 0.598, H_o 为 0.572, 多样性稍高于斑似鳢, 低于带鱼和竹荚鱼。

张健东等(2010)对湛江、北部湾和阳江 3 个不同地理群体的多鳞鲢进行了形态差异的研究, 揭示 3 个地理群体在形态上已经产生一定程度差异, 阳江群体的差异较其他 2 个群体的明显, 且形态差异主要体现在头部和尾部的纵向长短。本研究利用微卫星多态位点的数据分析了群体的基因固定指数(F_{st}), 其常用于评价亚群体遗传分化程度, 一般评判标准是 $F_{st}<0.05$ 代表分化较小, $0.05<F_{st}<0.15$ 代表中等分化, $0.15<F_{st}<0.25$ 代表高度分化, $0.25<F_{st}<1.00$ 代表极高度分化(Balloux *et al*, 2002)。本研究的 F_{st} 为 0.096—0.766, 各位点的平均 F_{st} 为 0.306, 表明多鳞鲢的 4 个地理群体分化极高, 这与张健东等(2010)的研究结果一致。笔者认为, 多鳞鲢地理群体高度分化的原因可

归纳为: 其一, 多鳞鱈为暖水性底层鱼类, 大多散栖在沿海近岸浅水沙质海底, 主要摄食底栖生物, 其生态习性决定了地理群体之间的分化。其二, 多鳞鱈尚未开展人工养殖, 虽有少量室内养殖试验的开展(杜涛等, 2009), 但未对多鳞鱈野生群体造成人为基因流。

王蕾等(2010)利用微卫星 DNA 对黄海、渤海海域 4 个不同海区牙鲆野生群体(大连、北戴河、丹东、青岛)进行群体遗传结构分析, 表明平均 H_e 为 0.820, H_o 为 0.753; Nei's 遗传距离青岛和大连之间最大(0.7352), 丹东和大连之间最小(0.3925), 其遗传分化与地理分布距离正相关, 且认为人工放流及人工繁育等对牙鲆的遗传多样性及基因流造成一定影响。本研究的结果表明, 三亚群体与汕尾群体的遗传分化程度最大(0.855), 湛江群体与北海群体的遗传分化程度最小(0.707), 也跟地理距离呈现正相关关系, 因此深入开展更多地理群体形态、生长性状与微卫星标记的相关性分析将是一项非常有意义的工作。

本研究的结果显示, 多鳞鱈汕尾、湛江、北海和三亚 4 个野生群体的杂合度较高, 群体间基因流极小, 存在极明显的遗传分化。这一研究结果对于将来生产工作中的良种选育有一定的指导意义, 也揭示多鳞鱈的遗传多样性水平虽然较高, 但必须及时采取有效措施对有限的资源进行保护, 并开展人工繁育满足人们对多鳞鱈的物质需求以达到对资源的可持续利用。

参 考 文 献

- 万瑞景, 1996. 多鳞鱈早期发育形态. 海洋水产研究, 17(1): 35—41
- 王 蕾, 张立冬, 万玉美等, 2010. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析. 遗传, 32(10): 1057—1064
- 卢振彬, 陈 骁, 杜建国, 2008. 闽南—台湾浅滩渔场多鳞鱈生长、死亡参数及种群动态. 海洋水产研究, 29(5): 47—53
- 杜 涛, 黄 洋, 2009. 多鳞鱈生物学特性及室内养殖试验. 水产养殖, (3): 1—3
- 张健东, 马 龙, 陈 刚等, 2010. 不同地理群体多鳞鱈的形态差异分析. 安徽农业科学, 38(11): 5678—5681
- 潘晓哲, 高天翔, 2010. 基于耳石形态的鳕属鱼类鉴别. 动物分类学报, 35(4): 799—805
- Alarcóna J A, Magoulasb A, Georgakopoulosb T *et al*, 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 230(1—4): 65—80
- Balloux F, Lugon M N, 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11(2): 155—165
- Bonferroni C E, 1935. Il calcolo delle assicurazioni su gruppi diteste. In: Studi in Onore Del Professore Salvatore Ortu Carboni (eds). Rome, Italy, 13—60
- Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3): 31—34
- Dae S C, Hye S A, Taeg Y O *et al*, 2009. Eleven new microsatellite markers in jack mackerel (*Trachurus japonicus*) derived from an enriched genomic library. Genes & Genomics, 31(6): 397—402
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Biol Inform Online, 1: 47—50
- Gao T X, Ji D P, Xiao Y S *et al*, 2011. Description and DNA Barcoding of a New *Sillago* Species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from Coastal Waters of China. Zoological Studies, 50(2): 254—263
- Guo Y, Wang Z, Yan C *et al*, 2012. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from *Sillago sihama*. Journal of Genetics, 91(1): e32—e36
- Haigh L, Donnellan S C, 2000. Characterization of microsatellite loci in King George Whiting *Sillaginodes punctata* Cuvier and Valenciennes (Percoidei: Sillaginidae). Molecular Ecology, 9(12): 2213—2215
- Lee C S, Hu F, Hirano R, 1981. Salinity tolerance of fertilized eggs and larval survival in the fish *Sillago sihama*. Marine Ecology Progress Series, 4(2): 169—174
- Liu D, Guo Y, Wang Z, 2012. Phylogenetics inferred from mitochondrial genome and control region of Silver Sillago, *Sillago sihama*. Mitochondrial DNA, DOI:10.3109/19401736.2012.674118
- McKay R J, 1992. FAO Species Catalogue. Sillaginid fishes of the world (family Sillaginidae). An annotated and illustrated catalogue of the sillago, smelt or Indo-Pacific whiting species known to date. FAO Fish, Synop, 125(14): 87
- Nei M, Jajima F, Tateno Y, 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. Journal of Molecular Evolution, 19(3): 153—170
- Peakall R, Peter E S, 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6(1): 288—295
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1—1659
- Wantiez L, 1993. Les poissons des fonds meubles du lagon Nord et de la Baie de Saint-Vincent de Nouvelle-Calédonie: Description des peuplements, structure et fonctionnement des communautés. Université d' Aix-Marseille II, France, 1—444
- Wen T Y, Felicia F, Gen H Y, 2007. Isolation and characterization of microsatellites from a marine foodfish species ribbonfish

Trichiurus haumela. Molecular Ecology Notes, 7(5): 781—783
 Zarraonaindia I, Pardo M A, Iriondo M *et al*, 2009. Microsatellite
 variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*)

calls for further investigation of its genetic structure and
 biogeography. ICES Journal of Marine Science, 66: 2176—
 2182

SSR ANALYSIS IN FOUR WILD POPULATIONS OF SILVER SILLAGO SILLAGO SIHAMA

GUO Yu-Song, YAN Cheng-Zhong, ZHANG Yu-Lan, ZHENG Jin-Nan,
 XU Yuan-Min, DU Tao, WANG Zhong-Duo, LIU Chu-Wu

(Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong
 Higher Education Institutes, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524088)

Abstract *Sillago sihama* is the most known species in genus *Sillago*. It is naturally distributed in Indo-West Pacific and found in all Chinese waters including East China Sea, Yellow Sea, Bohai Sea, South China Sea, and the Northern Bay. In China, it is a common marine food fish species, and the supply of this fish relies on capture from the wild. The resources have reduced dramatically. It is necessary to reveal genetic diversity and population structure of wild stocks before carry out breeding and farming. Genetic diversity of 4 wild geographical populations of *S. sihama* in the southern coast waters of China, i.e. four populations of Zhanjiang (ZJ), Beihai (BH), Shanwei (SW), and Sanya (SY), were investigated using 34 microsatellite DNA loci. The allele numbers (N_a), effective allele numbers (N_e), expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), polymorphism information contents (PIC) and Hardy-Weinberg equilibrium were estimated to characterize genetic diversity. The results show that all loci were polymorphic among populations. Test of departures from Hardy-Weinberg equilibrium indicated that 7 to 12 loci in each population were significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. All loci are not significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in all 4 populations. The N_e ranged from 1.71 to 20.46, and PIC ranged from 0.40 to 0.95. The average H_e was 0.598, and average H_o was 0.572 in four populations. The SY population showed the highest heterozygosity ($H_e = 0.606$, $H_o = 0.623$), while the SW population showed the lowest value ($H_e = 0.586$, $H_o = 0.508$). The results of genetic distances and genetic similarity show that the genetic relationship of BH and ZJ populations was the most closed, while that of SY and SW populations was opposite. The F -statistics analysis showed that the four populations were highly differentiated (F_{st} mean value is 0.306). There was only a very small gene flow between populations. NJ and UPGMA clustering tree based on D_A genetic distances demonstrated that the stocks of adjacent geographical position clustered together.

Key words *Sillago sihama*; microsatellite DNA; genetic diversity; genetic differentiation