

斑鳢基因组中微卫星分布特征及野生种群遗传结构分析

上官清^{1,2}, 陈昆慈¹, 刘海洋¹, 欧密¹, 罗青¹,
王亚坤¹, 徐晟云^{1,2}, 赵建¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,
广东广州 510380; 2. 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 斑鳢 (*Channa maculata*) 是华南地区的本土经济鱼类, 也是杂交鳢的亲本之一。养殖个体逃逸可能会对野生种群产生影响, 存在种质混杂的风险, 亟须开展野生资源的遗传背景分析。该研究分析了斑鳢基因组中微卫星标记的分布特征, 筛选获得 20 个多态性位点构建多重 PCR 体系, 对广州、化州、江华、南宁、阳江和邵武 6 个野生群体的遗传多样性和遗传结构进行了分析。结果显示, 6 个野生群体各位点的等位基因 (N_a) 为 3~28、有效等位基因 (N_e) 为 1.28~14.88、观测杂合度 (H_o) 为 0.10~1.00、期望杂合度 (H_e) 为 0.14~0.95 以及多态信息含量 (PIC) 为 0.13~0.95。UPGAM 系统进化树结果显示, 化州和福建种群遗传关系最近, 化州和江华种群遗传关系最远。该研究结果将为斑鳢的遗传监测和亲缘关系鉴定提供技术支持, 为斑鳢种质资源养护及管理提供参考。

关键词: 斑鳢; 遗传结构; 微卫星标记; 野生种群

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Characteristics of micorsatellites and genetic structure of wild *Channa maculata*

SHANGGUAN Qing^{1,2}, CHEN Kunci¹, LIU Haiyang¹, OU Mi¹, LUO Qing¹,
WANG Yakun¹, XU Shengyun^{1,2}, ZHAO Jian¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Tropical & Subtropical
Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Channa maculata* is not only an indigenous economic fish in South China but also a parent species of cultured hybrid snakehead. Escape of the bred individuals may have impacts on wild populations, which makes genetic background analysis of wild resources an urgently need. This study analyzed the distribution characteristics of microsatellite markers in genome of *C. maculata*, and developed 20 polymorphic loci to analyze the genetic diversity and genetic structure of six wild populations named as Guangzhou, Huazhou, Jianghua, Nanning, Yangjiang and Shaowu populations. The results show that the number of alleles (N_a) of the six wild populations was 3–28; the number of effective alleles (N_e) was 1.28–14.88; the observed heterozygosity (H_o) was 0.10–1.00; the expected heterozygosity (H_e) was 0.14–0.95; the polymorphic information content (PIC) was 0.13–0.95. The UPGAM dendrogram indicates that the genetic relationship between Huazhou and Fujian populations was the closest, but that between Huazhou and Jianghua populations was the farthest. This study provides basis for the conservation and management of germplasm resources of *C. maculata*.

Key words: *Channa maculata*; Genetic structure; Microsatellite marker; Wild population

收稿日期: 2019-10-11; 修回日期: 2019-12-12

资助项目: 广州市科技计划项目珠江科技新星专项 (201710010174); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-46); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD34; 2019XT0601); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201501A08)

作者简介: 上官清 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖。E-mail: 664948706@qq.com

通信作者: 赵建 (1982—), 男, 副研究员, 从事水产种质资源与遗传育种研究。E-mail: zhaojian@prfri.ac.cn

斑鳢 (*Channa maculata*) 隶属于硬骨鱼纲、鲈形目、攀鲈亚目、鳢科、鳢属^[1], 是我国重要的淡水经济鱼类^[2]。其与乌鳢 (*Channa argus*) 杂交获得的杂交鳢具有明显的杂种优势^[3], 已成为主要养殖品种之一。随着鳢的养殖规模逐渐扩大, 苗种和亲本需求量剧增, 而斑鳢亲本源于早期饲料驯化群体, 遗传多样性较低, 近年来出现了近亲繁殖、种质退化, 抗病能力下降等问题。同时由于杂交鳢可育, 养殖群体逃逸到自然群体中会造成野生群体遗传混杂等问题, 亟需开展野生资源的遗传背景分析。

开展鱼类种群遗传背景研究有多种方法, 包括形态学、同工酶及 DNA 水平。如陈薛伟杰等^[4]利用形态学与框架分析法研究锦江和乌江大眼鲈 (*Siniperca kneri*) 群体与北盘江群体的形态差异; 舒琬等^[5]通过可量性状及框架结构发现华南及邻近地区的大刺鲃 (*Mastacembelus armatus*) 形态上存在明显分化; 张龙岗等^[6]发现苹果酸脱氢酶 (MDH) 和乙醇脱氢酶 (ADH) 可辨别乌鳢和杂交鳢。然而, 以上均是对物种遗传变异的间接性反映, 无法直接呈现出个体或群体间的遗传变异, 而 DNA 序列的变异是遗传物质的改变, 能够直接反映群体的遗传多样性和分化状况。

随着分子生物学的发展, DNA 水平上的变异检测先后发展出限制性内切酶片段长度多态性 (Re-

striction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA 标记 (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)、微卫星 (Simple sequence repeats, SSR) 等多种方法。其中, 微卫星作为一种共显性标记, 具有分布广、数量多、多态性信息丰富以及易于检测等优点, 已被广泛用于群体遗传、多样性监测、家系鉴定等工作^[7-8]。目前已有利用微卫星标记对二长棘鲷 (*Parargyrops edita*)^[9]、红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*)^[10]、鲍^[11]、青蟹 (*Scylla paramamosain*)^[12] 等进行种群遗传多样性研究的报道。

本研究利用高通量测序的方法对斑鳢进行微卫星标记开发, 筛选多态性标记对我国自然分布区代表性野生群体进行种群遗传分析, 为其种质的合理利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017 年 4 月至 2018 年 9 月, 分别从广东、广西、福建、湖南等斑鳢自然分布地采集到 196 尾活体样本, 取其部分尾鳍置于含无水乙醇的离心管中, 后带回实验室 -20 ℃ 保存备用。样本采集信息见表 1, 采样点分布见图 1。

表1 斑鳢采集位置及数量

Table 1 Sampling sites and quantity of *C. maculata* in this study

群体编号 Population No.	采样地点 Sampling site	经纬度 Coordinate	所属江段 (水系) Water system	样本数量 Quantity of samples	样本采集部位 Tissue of samples
1	广州 GZ	112.25°E, 23.06°N	河口 (珠江)	29	鳍条
2	化州 HZ	110.65°E, 21.92°N	鉴江	30	鳍条
3	江华 JH	111.58°E, 26.43°N	湘江	35	鳍条
4	南宁 NN	108.22°E, 22.79°N	邕江 (珠江)	33	鳍条
5	阳江 YJ	111.78°E, 22.26°N	漠阳江	41	鳍条
6	邵武 SW	117.49°E, 27.34°N	闽江	28	鳍条

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 参照试剂盒 (美国 OMEGA Bio-Tek 公司) NO. D3096-02 说明书提取基因组 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行检测, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 高通量测序与 SSR 分析 使用 HiSeq2500 高通量测序仪 (Illumina, USA) 对斑鳢基因组 DNA 进行“全基因组随机测序”, 测序服务由深圳华大海洋科技有限公司提供。全基因组测序完成

后进行拼接, 过滤掉接头和低质量序列, 使用软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>) 搜索微卫星位点。

1.2.3 引物设计与合成 从获得的微卫星序列中, 挑选在不同的 Scaffold 上, 重复次数介于 20~45 的微卫星片段, 若在相同 Scaffold 上, 则选择在基因组中间距 5 Mb 以上的微卫星片段进行克隆, 参考张新宇和高燕宇^[13]引物设计原则, 使用 Primer 5.0 软件设计引物。在正向引物 5'端分别添

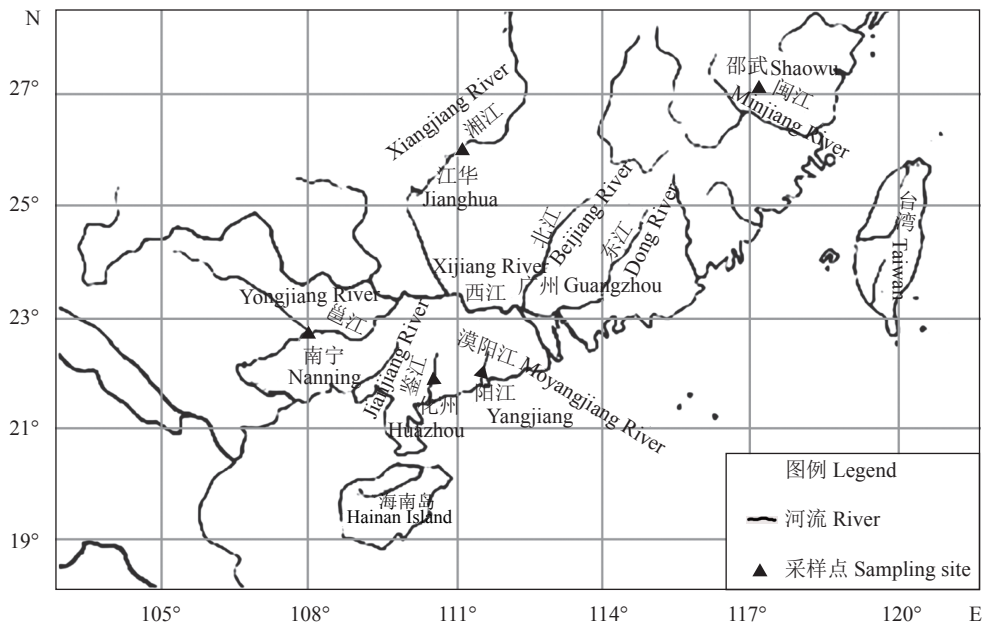


图1 斑鳢各群体采样地点

Figure 1 Sampling sites of six *C. maculata* populations

加用蓝色 (FAM: AGCTCGACCAGTGAGTCAG)、红色 (PET: CACGACGTTGTAACGAC) 和绿色 (VIC: CAGGAAGTCAGTGACACTC) 标记的不同接头序列, 并交由广州天一辉远基因科技有限公司合成。

1.2.4 引物的筛选 引物筛选参考 Wang 等^[14] 的描述。

1.2.5 数据统计 采用 Peak Scanner Software 1.0 软件对荧光标记微卫星进行基因型判定, 并记录在 Excel 表格中。利用 Popgen 32 来计算等位基因 (N_a), 有效等位基因 (N_e), 观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e); 使用 Cervus 软件统计多态信息含量 (PIC) 和哈迪-温伯格平衡 (HWE) 等种群遗传学参数; 利用 Arlequin 3.1 软件计算种群间遗传距离、遗传分化系数 (F_{ST}) 和 AMOVA 方法分析 6 个群体的遗传差异; 最后根据遗传距离在 MEGA 5.1 软件中构建 UPMGA 进化树。

2 结果

2.1 斑鳢基因组中微卫星标记的分布

测序获得的数据量为 318.4 Gb, 经过处理组装得到基因组大小为 627 Mb, 共获得微卫星序列 355 297 条。检测出的 SSR 包含 1、2、3、4 和 5 个碱基重复单元的个数分别是 187 962、139 672、20 272、6 059 和 1 094, 5 种重复微卫星出现频率分别是 49.76%、26.30%、14.26%、7.29% 和 2.40% (表 2)。随着碱基数的增加, 不同重复单元出现的频率呈明显下降趋势。

在单碱基重复中, A/T 类型出现的频率最高 (66.14%); 2 碱基重复中, AC/GT 类型出现的频率最高 (58.63%); 3 碱基重复的 SSR 中 AAC/GTT 类型出现的频率最高 (17.21%); 4 碱基重复的 SSR 中 AAAC/GTTT 类型出现的频率最高 (7.77%); 5 碱基重复中, AAAGG/CCTTT 类型出现的频率最高 (2.75%), 不同重复单元 SSR 的出现频率见表 3。

表2 斑鳢基因组序列中不同重复单元微卫星分布情况

Table 2 Distribution of different types of SSR in genomic sequence

单元碱基数 Number of base	重复类型 Type of repeat	SSR数目 Number of SSR	出现频率 Frequency/%	平均分布频率 Average distribution frequency/kb
1	2	187 962	49.76	3.34
2	4	139 672	26.30	4.49
3	10	20 272	14.26	20.27
4	31	6 059	7.29	103.46
5	66	1 094	2.40	573.01

重复单元 Repeat unit	重复次数 Repeat times																		合计 Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	≥21		
A/T	—	—	—	—	—	47 951	30 595	20 655	15 009	11 498	9 085	7 334	5 685	4 358	3 348	2 714	2 201	328 141	
C/G	—	—	—	—	—	4 830	3 552	2 415	1 320	737	462	365	288	214	183	154	97	167 999	
AC/GT	—	22 654	13 182	9 847	8 188	7 081	6 526	6 013	5 537	4 869	4 257	3 276	2 581	2 468	2 182	1 635	1 455	153 757	
AG/CT	—	7 028	3 756	2 298	1 487	1 043	838	637	583	524	424	351	280	293	265	211	183	52 034	
AT/AT	—	2 594	1 476	884	608	461	265	231	206	160	95	99	60	42	21	16	18	31 836	
CG/CG	—	171	83	20	11	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24 620	
AAC/GTT	1 261	599	314	200	132	84	50	21	25	11	11	5	6	2	3	3	—	24 463	
AAG/CTT	816	303	181	105	68	54	33	30	24	14	9	9	12	6	9	3	2	21 742	
AAT/ATT	2 464	1 134	652	424	357	297	239	231	198	148	125	80	53	50	34	38	22	20 065	
ACC/GGT	478	203	106	66	33	20	8	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13 711	
ACG/CGT	22	12	4	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	12 850	
ACT/AGT	484	194	132	102	66	52	41	27	21	26	16	17	8	7	6	2	5	13 683	
AGC/CTG	1 119	530	294	183	118	68	41	25	15	9	10	4	2	1	1	1	1	12 485	
AGG/CCT	1 198	525	321	220	121	86	45	35	17	14	5	—	3	1	—	—	—	10 071	
ATC/ATG	754	438	261	181	103	63	46	27	19	13	10	6	6	—	4	—	—	7 496	
CCG/CGG	59	14	3	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5 611	
AAAC/GTTT	569	257	120	41	24	3	9	4	3	2	1	1	1	—	2	1	—	5 643	
AAAG/CTTT	138	72	38	34	25	16	9	7	6	2	3	2	—	—	—	—	1	4 975	
AAAAT/ATTT	896	315	102	35	9	4	3	—	1	1	—	—	—	—	—	3	—	4 624	
AACC/GGTT	21	9	5	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 260	
AACG/CGTT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 288	
AACT/AGTT	38	13	6	8	1	3	2	2	—	—	—	—	—	1	—	—	—	3 315	
AAGC/CTTG	4	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	3 286	
AAGG/CCTT	30	18	7	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 289	
AAGT/ACTT	32	9	5	2	2	—	2	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	3 242	
AATC/ATTG	88	40	30	17	13	11	3	3	2	—	—	1	—	—	1	—	1	3 192	
AATG/ATTC	96	51	26	14	7	11	4	3	1	—	1	—	—	—	—	—	—	3 000	
AATT/AATT	43	11	9	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 797	
ACAG/CTGT	160	63	36	11	5	5	4	1	2	2	—	1	1	—	—	—	—	2 738	
ACAT/ATGT	152	81	52	29	17	9	12	6	5	3	3	—	2	1	1	2	—	2 458	
ACCC/GGGT	24	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 101	
ACCG/CGGT	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 076	
ACCT/AGGT	13	5	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2 090	
ACGC/CGTG	73	35	12	2	3	1	3	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	2 071	
ACGG/CCGT	5	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 941	
ACGT/ACGT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 938	
ACTC/AGTG	80	42	12	23	12	5	3	4	1	2	3	3	—	2	—	—	—	1 938	
ACTG/AGTC	25	14	9	2	1	1	1	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	1 751	
AGAT/ATCT	230	159	122	69	70	51	40	32	17	25	11	16	6	11	4	7	3	1 710	
AGCC/CTGG	3	1	2	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	852	
AGCG/CGCT	7	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	845	
AGCT/AGCT	14	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	853	
AGGC/CCTG	22	9	7	5	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	838	

to be continued

重复单元 Repeat unit	重复次数 Repeat times																	合计 Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	≥21	
AGGG/CCCT	65	33	10	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	892
ATCC/ATGG	186	78	54	22	14	7	4	1	1	2	—	—	1	—	—	—	—	787
ATCG/ATCG	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	429
ATGC/ATGC	2	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	442
AAAAC/GTTTT	47	17	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	474
AAAAG/CTTTT	15	3	4	—	—	2	1	—	1	—	1	1	—	—	—	—	—	410
AAAAT/ATTTT	35	6	3	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	404
AAACC/GGTTT	5	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	361
AAACT/AGTTT	7	3	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	353
AAAGC/CTTTG	2	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	345
AAAGG/CCTTT	7	5	1	2	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	658
AAAGT/ACTTT	4	2	1	—	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	644
AAATC/ATTTG	2	—	3	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	634
AAATT/AATTT	8	—	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	631
AACAC/GTGTT	7	8	—	—	—	1	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	632
AACAG/CTGTT	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	623
AACAT/ATGTT	9	3	4	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	637
AACCC/GGGTT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	621
AACCT/AGGTT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	621
AACTG/AGTTC	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	621
AACTT/AAGTT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	622
AAGAC/CTTGT	—	1	1	—	—	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	627
AAGAG/CTCTT	8	1	1	2	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	623
AAGAT/ATCTT	7	2	4	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	611
AAGCC/CTTGG	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	598
AAGCT/AGCTT	13	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	598
AAGGT/ACCTT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	602
AAGTC/ACTTG	74	11	10	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	602
AAGTG/ACTTC	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	506
AATAC/ATTGT	9	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	503
AATAG/ATTCT	5	3	4	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	492
AATAT/ATATT	19	10	2	1	—	—	2	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	493
AATCC/ATTGG	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	581
AATCT/AGATT	15	3	1	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	583
AATGC/ATTGC	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	564
AATGG/ATTCC	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	563
AATGT/ACATT	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	564
AATTC/AATTG	241	56	9	6	2	—	—	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	561
ACACC/GGTGT	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	246
ACACG/CGTGT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	245
ACACT/AGTGT	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	245
ACAGC/CTGTG	8	3	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	259
ACAGG/CCTGT	4	3	—	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	251
ACAGT/ACTGT	12	3	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	242

续表 3 to be continued

重复单元 Repeat unit	重复次数 Repeat times																	合计 Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	≥21	
ACATC/ATGTG	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	225
ACATG/ATGTC	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	224
ACCAG/CTGGT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	223
ACCAT/ATGGT	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	222
ACCCC/GGGGT	5	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	218
ACCGG/CCGGT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	212
ACCTC/AGGTG	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	211
ACGAG/CGTCT	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	209
ACGAT/ATCGT	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	207
ACTAT/AGTAT	7	5	1	3	3	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	206
ACTCC/AGTGG	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	186
ACTCT/AGAGT	1	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	185
ACTGC/AGTGC	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	181
ACTGG/AGTCC	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	179
AGAGC/CTCTG	13	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	178
AGAGG/CCTCT	42	29	7	5	8	12	3	12	4	2	—	1	—	—	—	—	—	162
AGATC/ATCTG	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37
AGATG/ATCTC	1	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34
AGCAT/ATGCT	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31
AGCCC/CTGGG	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30
AGCGG/CCGCT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28
AGCTC/AGCTG	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	27
AGGCC/CCTGG	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25
AGGGC/CCCTG	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	22
AGGGG/CCCCT	12	2	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21
ATATC/ATATG	3	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4

以碱基重复数为横坐标，SSR 数量为纵坐标，结果见图 2，SSR 数量随着碱基重复次数的增加明显减少。

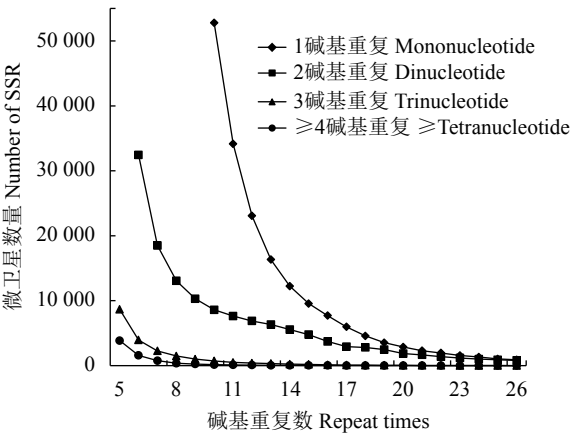


图2 基因组中微卫星数量随碱基重复次数变化趋势
Figure 2 Variation curve of number of SSRs in genome with repeat times

2.2 斑鳢多态性微卫星标记筛选与多重 PCR 体系构建

使用 Primer 5.0 软件设计引物 30 对，根据 Wang 等^[14]描述最终筛选出 20 个具有多态性且能稳定扩增的位点，构建 7 个多重 PCR 体系，用于 6 个斑鳢野生群体的扩增，结果见表 4。

2.3 斑鳢不同地理种群遗传多样性分析

本研究中斑鳢的 6 个群体各位点的 N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 分别介于 3~28、1.28~14.88、0.10~1.00、0.14~0.95、0.13~0.95；各群体的 N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 和 PIC 分布介于 6.4~13.45、2.53~9.44、0.287 8~0.661 9、0.520 5~0.874 5、0.480 5~0.848 1，6 个群体中，群体 JH 遗传多样性相对较低(0.480 5)，其余群体均呈现较高的多态性(PIC>0.5)，结果见表 5。另外结果显示 6 个斑鳢群体的 Hardy-Weinberg 平衡偏离常数均小于 0.05，说明 6 个斑鳢群体具有极显著的遗传不平衡。单群体单基因座检测结

表4 斑鳢微卫星位点相关信息
Table 4 Information of 20 microsatellite loci from *C. maculata*

多重PCR Multiplex PCR	位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence	简单重复单元 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature/°C	荧光标记 Fluorescent label
Multiplex set 1	BCM83	F: TGAGAGATTTCCTGGGAGAATTA R: AACAGAACAAACACAGAAAAGGC	(ATA) ₃₃	60	FAM
	BCM9	F: AACTGAACCTCATTGAGAACCA R: CTATCACCCAGTAAACTGCATCC	(AC) ₃₂	61	PET
	BCM94	F: TAAATTTAAATGCCACATGGGAG R: GCAACCAAAAATGTAGGAGTCTG	(AAAC) ₃₂	61	VIC
Multiplex set 2	BL-12	F: ACACCATAACAGTGACAA R: GAGCAGAGTCAGTGTAGGTT	(TCTA) ₂₄	59	FAM
	BL-18	F: CCATACCTACCCAACCTG R: CATCCTCATCCAGACCAT	(GATA) ₂₅	59	PET
	BL-19	F: ATCCATACCTACCCAACC R: CATCCTCATCCAGACCAT	(AGAT) ₂₂	60	VIC
Multiplex set 3	BCM90	F: ATATATTCCCATGCTGTGTGTC R: TTGTATTGTCAAAATTGTGTGCG	(AC) ₃₂	61	FAM
	BCM11	F: TGCAAAGCACGATAAGAACTACA R: TATCAAAACTTGCTGCCAATAGC	(TAA) ₃₃	58	PET
	BL-4	F: AAAGAGGAGATTCTGGAT R: CTGCCTGTTGTCTGTCA	(AGA) ₄₂	59	VIC
Multiplex set 4	BCM97	F: CCCTCACTCTCTATCCAGTCCTT R: GAGGGGAAATAGCCAGTGTAATG	(AC) ₃₂	60	FAM
	BL-24	F: TTGCCTTGTACTGACATT R: CTCCCATAGTGCTCCGTG	(TCTA) ₂₉	61	VIC
	BL-33	F: TGACACTCACAGCCTCAG R: CACAACGTGGGATACAAT	(ATCT) ₂₄	58	PET
Multiplex set 5	BCM87	F: GTTTTACCACAGCCAAAACTG R: CTGGAATACATTGCTGTCTAGC	(GT) ₃₂	60	FAM
	BCM10	F: TTTGTCTGGCAAACACTTTAGA R: CTTTGGCCCAAGTAGTCATATTT	(ATA) ₃₃	62	PET
Multiplex set 6	BCM95	F: CACATGCTCCCTATAGACAGTCC R: TATGTGAGCCGGATGATAGAGTT	(AC) ₃₂	59	FAM
	BL-3	F: GATTGAACCACTCACCTT R: GTAAGAAGCAGCATTGCA	(GTA) ₄₀	61	PET
	BL-21	F: TGACACTCACAGCCTCAG R: CACAACGTGGGATACAAT	(ATCT) ₂₄	58	FAM
Multiplex set 7	BCM91	F: CAAGAAGAAGACTGATACTGGGG R: GATACAGGCATCCAAATTCTGAG	(GT) ₃₂	59	FAM
	BCM12	F: TGTAAGAAGCAGCTATTCTTTGTTTC R: CAACACTACCACCACCACAATA	(TTA) ₃₃	60	PET
	BL-34	F: GGAAGAAGCTGTAAGAGG R: AGTTGGCAATGGTGGAGA	(AAAC) ₂₂	58	VIC

表5 6个斑鳢群体的多样性指数
Table 5 Genetic diversity indices of six *C. maculata* populations

位点 Locus	指数 Index	群体 Population						平均 Total
		广州 GZ	化州 HZ	江华 JH	南宁 NN	阳江 YJ	邵武 SW	
BCM83	N_a	11	8	4	8	10	8	8.166 7
	N_e	4.380 2	4.054 1	1.389 7	3.716 7	6.502 9	5.351 5	4.232 5
	H_o	0.793 1	0.500 0	0.028 6	0.697 0	0.829 3	0.392 9	0.540 2
	H_e	0.785 2	0.766 1	0.284 5	0.742 2	0.856 7	0.827 9	0.710 4
	PIC	0.741 0	0.719 0	0.267 0	0.692 0	0.828 0	0.789 0	0.672 7
	HWE	0.000 0	0.056 9	0.000 0	0.402 3	0.000 0	0.000 0	—
BCM9	N_a	5	13	8	15	9	8	9.666 7
	N_e	2.248 7	7.058 8	3.319 8	8.126 9	2.333 1	4.639 1	4.621 1
	H_o	0.551 7	0.633 3	0.057 1	0.666 7	0.487 8	0.250 0	0.441 1
	H_e	0.565 0	0.872 9	0.708 9	0.890 4	0.578 4	0.798 7	0.735 7
	PIC	0.524 0	0.844 0	0.655 0	0.866 0	0.550 0	0.751 0	0.698 3
	HWE	0.000 0	0.034 6	0.000 0	0.002 0	0.000 0	0.000 0	—
BL-12	N_a	8	17	8	9	21	11	12.333 3
	N_e	2.624 0	13.235 3	2.608 4	3.882 4	11.940 3	7.009 6	6.883 3
	H_o	0.413 8	0.633 3	0.484 8	0.818 2	0.850 0	0.555 6	0.626 0
	H_e	0.629 8	0.940 1	0.626 1	0.753 8	0.927 8	0.873 5	0.791 9
	PIC	0.580 0	0.919 0	0.552 0	0.715 0	0.911 0	0.843 0	0.753 3
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.231 8	0.000 0	0.000 0	—
BL-18	N_a	6	15	4	11	14	12	10.333 3
	N_e	4.805 7	9.556 8	2.688 9	3.067 6	7.837 3	8.615 4	6.095 3
	H_o	0.965 5	0.724 1	0.787 9	0.606 1	0.764 7	0.321 4	0.695 0
	H_e	0.805 8	0.911 1	0.637 8	0.684 4	0.885 4	0.900 0	0.804 1
	PIC	0.760 0	0.887 0	0.555 0	0.656 0	0.860 0	0.873 0	0.765 2
	HWE	0.005 8	0.000 0	0.000 0	0.000 1	0.000 0	0.000 0	—
BL-19	N_a	6	16	4	11	16	12	10.833 3
	N_e	4.805 7	9.523 8	2.688 9	3.071 9	7.305 9	8.209 4	5.934 3
	H_o	0.965 5	0.666 7	0.787 9	0.575 8	0.700 0	0.285 7	0.663 6
	H_e	0.805 8	0.910 2	0.637 8	0.684 8	0.874 1	0.894 2	0.801 2
	PIC	0.760 0	0.887 0	0.555 0	0.657 0	0.850 0	0.867 0	0.762 7
	HWE	0.005 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—
BCM90	N_a	4	9	5	6	6	6	6.000 0
	N_e	2.345 9	5.056 2	2.411 4	1.716 7	2.614 3	3.359 4	2.917 3
	H_o	0.586 2	0.766 7	0.514 3	0.375 0	0.487 8	0.703 7	0.572 3
	H_e	0.583 8	0.815 8	0.593 8	0.424 1	0.625 1	0.715 6	0.626 4
	PIC	0.484 0	0.775 0	0.535 0	0.395 0	0.549 0	0.655 0	0.565 5
	HWE	0.364 7	0.245 4	0.000 0	0.001 7	0.506 0	0.616 0	—
BCM11	N_a	9	16	8	14	14	18	13.166 7
	N_e	7.218 9	11.612 9	1.354 3	7.920 0	6.146 3	9.467 5	7.286 7
	H_o	0.931 0	0.866 7	0.142 9	0.969 7	0.926 8	0.888 9	0.787 7
	H_e	0.876 6	0.929 4	0.265 4	0.887 2	0.847 6	0.911 3	0.786 3
	PIC	0.846 0	0.907 0	0.256 0	0.862 0	0.819 0	0.886 0	0.762 7
	HWE	0.002 5	0.296 9	0.000 0	0.931 0	0.000 0	0.478 9	—

续表 5

to be continued

位点 Locus	指数 Index	群体 Population						平均 Total
		广州 GZ	化州 HZ	江华 JH	南宁 NN	阳江 YJ	邵武 SW	
BL-4	N_a	9	24	11	22	28	17	18.500 0
	N_e	3.706 9	15.929 2	7.538 5	13.212 9	9.261 7	12.255 3	10.317 4
	H_o	0.428 6	0.533 3	0.142 9	0.593 8	0.463 4	0.333 3	0.415 9
	H_e	0.743 5	0.953 1	0.899 5	0.939 0	0.903 0	0.937 9	0.896 0
	PIC	0.706 0	0.942 0	0.855 0	0.947 0	0.887 0	0.913 0	0.875 0
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—
BCM97	N_a	6	9	5	7	11	9	7.833 3
	N_e	3.985 8	4.663 2	1.284 2	2.722 5	5.766 7	5.444 4	3.977 8
	H_o	1.000 0	0.633 3	0.151 5	0.575 8	0.829 3	0.857 1	0.674 5
	H_e	0.762 3	0.798 9	0.224 7	0.642 4	0.836 8	0.831 2	0.682 7
	PIC	0.714 0	0.762 0	0.211 0	0.573 0	0.809 0	0.792 0	0.643 5
	HWE	0.000 1	0.197 4	0.000 0	0.000 0	0.011 9	0.108 5	—
BL-24	N_a	10	16	5	12	14	8	10.833 3
	N_e	4.792 0	9.045 2	1.976 8	9.151 3	5.520 2	5.807 4	6.048 8
	H_o	0.724 1	0.500 0	0.000 0	0.848 5	0.702 7	0.321 4	0.516 1
	H_e	0.805 2	0.904 5	0.502 0	0.904 4	0.830 1	0.842 9	0.798 2
	PIC	0.763 0	0.880 0	0.462 0	0.881 0	0.804 0	0.805 0	0.765 8
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.215 7	0.000 0	0.000 0	—
BL-33	N_a	8	21	8	11	14	16	13.000 0
	N_e	4.847 3	14.754 1	2.927 1	2.773 4	3.705 2	8.166 7	6.195 6
	H_o	0.689 7	0.700 0	0.428 6	0.322 6	0.435 9	0.607 1	0.530 7
	H_e	0.807 6	0.948 0	0.667 9	0.649 9	0.739 6	0.893 5	0.784 4
	PIC	0.765 0	0.928 0	0.622 0	0.623 0	0.693 0	0.867 0	0.749 7
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.003 1	—
BCM87	N_a	8	9	5	9	10	9	8.333 3
	N_e	4.072 6	4.422 6	1.436 1	4.204 6	5.345 0	5.333 3	4.135 7
	H_o	0.724 1	0.466 7	0.000 0	0.606 1	0.829 3	0.535 7	0.527 0
	H_e	0.767 7	0.787 0	0.308 1	0.773 9	0.822 9	0.827 3	0.714 5
	PIC	0.725 0	0.750 0	0.290 0	0.732 0	0.791 0	0.788 0	0.679 3
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 1	0.000 0	0.000 0	—
BCM10	N_a	6	17	9	12	15	10	11.500 0
	N_e	3.689 4	10.526 3	4.702 5	5.613 4	9.391 1	6.400 0	6.720 5
	H_o	0.714 3	0.700 0	0.600 0	0.697 0	0.634 1	0.250 0	0.599 2
	H_e	0.742 2	0.920 3	0.798 8	0.834 5	0.904 5	0.859 1	0.843 2
	PIC	0.680 0	0.898 0	0.758 0	0.804 0	0.884 0	0.825 0	0.808 2
	HWE	0.000 0	0.000 1	0.000 0	0.015 6	0.000 0	0.000 0	—
BCM95	N_a	9	21	8	14	13	15	13.333 3
	N_e	5.339 7	13.235 3	2.110 2	11.000 0	6.331 5	7.466 7	7.580 6
	H_o	0.724 1	0.633 3	0.200 0	0.757 6	0.756 1	0.607 1	0.613 0
	H_e	0.827 0	0.940 1	0.533 7	0.923 1	0.852 5	0.881 8	0.826 4
	PIC	0.789 0	0.920 0	0.505 0	0.902 0	0.825 0	0.853 0	0.799 0
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.029 9	0.000 0	0.000 0	—

续表 5 to be continued

位点 Locus	指数 Index	群体 Population						平均 Total
		广州 GZ	化州 HZ	江华 JH	南宁 NN	阳江 YJ	邵武 SW	
BL-3	N_a	9	14	10	19	18	14	14.000 0
	N_e	3.112 8	10.055 2	1.784 4	14.222 2	10.568 8	9.49 02	8.205 6
	H_o	0.150 0	0.333 3	0.171 4	0.458 3	0.208 3	0.409 1	0.288 4
	H_e	0.696 2	0.917 5	0.446 0	0.949 5	0.924 6	0.915 4	0.808 2
	PIC	0.653 0	0.892 0	0.430 0	0.925 0	0.898 0	0.886 0	0.780 7
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—
BL-21	N_a	11	21	7	11	15	17	13.666 7
	N_e	5.360 3	14.876 0	2.822 6	2.998 2	4.224 1	9.286 6	6.594 6
	H_o	0.629 6	0.666 7	0.514 3	0.275 9	0.542 9	0.925 9	0.592 6
	H_e	0.828 8	0.948 6	0.655 1	0.678 2	0.774 3	0.909 2	0.799 0
	PIC	0.791 0	0.929 0	0.602 0	0.648 0	0.737 0	0.883 0	0.765 0
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.120 0	—
BCM91	N_a	8	6	3	8	8	7	6.666 7
	N_e	1.783 7	2.125 1	1.155 1	2.550 4	3.379 1	4.215 1	2.534 8
	H_o	0.103 4	0.333 3	0.028 6	0.363 6	0.450 0	0.107 1	0.231 0
	H_e	0.447 1	0.538 4	0.136 2	0.617 2	0.713 0	0.776 6	0.538 1
	PIC	0.427 0	0.506 0	0.128 0	0.567 0	0.654 0	0.733 0	0.502 5
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—
BCM12	N_a	11	21	7	11	15	17	13.666 7
	N_e	5.360 3	14.876 0	2.822 6	2.998 2	4.224 1	9.286 6	6.594 6
	H_o	0.629 6	0.666 7	0.514 3	0.275 9	0.542 9	0.925 9	0.592 6
	H_e	0.828 8	0.948 6	0.655 1	0.678 2	0.774 3	0.909 2	0.799 0
	PIC	0.791 0	0.929 0	0.602 0	0.648 0	0.737 0	0.883 0	0.765 0
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.120 0	—
BL-34	N_a	6	11	5	8	11	8	8.166 7
	N_e	2.805 0	7.409 7	1.407 2	6.135 2	6.387 2	5.695 3	4.9733
	H_o	0.892 9	0.689 7	0.029 4	0.787 9	0.800 0	0.259 3	0.576 5
	H_e	0.655 2	0.880 2	0.293 7	0.849 9	0.854 1	0.840 0	0.728 9
	PIC	0.576 0	0.850 0	0.278 0	0.817 0	0.827 0	0.802 0	0.691 7
	HWE	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.087 2	0.000 0	0.000 0	—
BCM94	N_a	3	12	4	5	7	3	5.666 7
	N_e	2.326 4	6.766 9	2.117 5	2.472 2	4.650 1	2.217 8	3.425 2
	H_o	0.620 7	0.633 3	0.171 4	0.333 3	0.634 1	0.107 1	0.416 7
	H_e	0.580 2	0.866 7	0.535 4	0.604 7	0.794 6	0.559 1	0.656 8
	PIC	0.507 0	0.837 0	0.492 0	0.545 0	0.754 0	0.475 0	0.601 7
	HWE	0.006 0	0.005 6	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 0	—

注: N_a . 等位基因; N_e . 有效等位基因; H_o . 观测杂合度; H_e . 期望杂合度; PIC. 多态信息含量; HWE. Hardy-Weinberg 平衡偏离常数
Note: N_a . Number of alleles; N_e . Effective number of alleles; H_o . Observed heterozygosity; H_e . Expected heterozygosity; PIC. Polymorphism Information Content; HWE. Hardy-Weinberg

果显示, 79.17% 表现为极显著的遗传不平衡 ($P<0.01$); 7.5% 表现为显著的遗传不平衡 ($0.01<P<0.05$); 13.33% 表现为遗传平衡状态 ($P>0.05$)。

2.4 斑鳢群体间遗传分化分析

利用 Arlequin 3.1 软件得到 6 个斑鳢群体间的遗传距离 (表 6), GZ 和 JH 群体间遗传距离最大

(0.476 072), NN 和 JH 群体间次之 (0.402 79), HZ 和 SW 群体间最小 (0.065 88)。基于 UPMGA 法利用 MEGA 5.1 软件对 6 个斑鳢群体进行聚类分析, 结果显示, HZ 和 SW 群体遗传距离最小, 首先聚为一支, 紧接着与 YJ 群体聚为一支, 之后与 NN 和 GZ 群体聚为一支, 最后与 JH 群体聚为一支 (图 3)。

表6 6个斑鳢群体间的遗传距离
Table 6 Genetic distance among six *C. maculata* populations

群体 Population	广州 GZ	化州 HZ	江华 JH	南宁 NN	阳江 YJ	邵武 SW
广州 GZ						
化州 HZ	0.117 69					
江华 JH	0.476 72	0.268 98				
南宁 NN	0.153 89	0.079 37	0.402 79			
阳江 YJ	0.120 51	0.067 34	0.361 52	0.106 18		
邵武 SW	0.154 59	0.065 88	0.399 60	0.114 65	0.066 38	

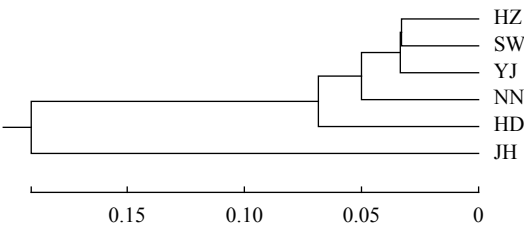


图3 6个斑鳢群体的UPGMA聚类树图

Figure 3 UPGMA dendrogram of six *C. maculata* populations

AMOVA 分析结果表明 6 个斑鳢群体间的两两遗传分化系数 F_{ST} 介于 0.061 8~0.322 8 (表 7), 群体间的遗传分化达到了极显著性水平 ($P<0.01$)。其中 GZ 和 JH 群体间的 F_{ST} 值最大 (0.322 8), NN 和 JH 群体次之 (0.287 1), HZ 和 SW 群体间最小 (0.061 8)。群体内和群体间的遗传变异分析结果显示, 在总的遗传变异中, 群体间的遗传变异占 15.18%, 而群体内的遗传变异占 84.82% (表 8)。

表7 6个斑鳢群体的遗传分化系数 (F_{ST} , 对角线下) 和基因流 (N_m , 对角线上)

Table 7 Gene differentiation (F_{ST} , above the diagonal) and gene flow indices (N_m , below the diagonal) among six *C. maculata* populations

群体 Population	广州 GZ	化州 HZ	江华 JH	南宁 NN	阳江 YJ	邵武 SW
广州 GZ	—	2.124 4	0.524 4	1.624 5	2.074 5	1.617 2
化州 HZ	0.105 3	—	0.929 4	3.150 0	3.712 6	3.794 7
江华 JH	0.322 8	0.212 0	—	0.620 7	0.691 5	0.625 6
南宁 NN	0.133 4	0.073 5	0.287 1	—	2.354 7	2.180 7
阳江 YJ	0.107 6	0.063 1	0.265 5	0.096 0	—	3.766 1
邵武 SW	0.133 9	0.061 8	0.285 5	0.102 9	0.062 3	—

注: $N_m=0.25(1-F_{ST})/F_{ST}$, 下表同此

Note: The same below

表8 6个斑鳢群体的AMOVA分析
Table 8 Analysis on molecular variance (AMOVA) of six *C. maculata* populations

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance component	变异百分比 Variation percentage/%
群体间 Among populations	460.645	1.347 32	15.18
群体内 Within populations	2 796.240	7.529 68	84.82
合计 Total	3 256.884	8.877 00	—

3 讨论

传统的微卫星分离技术主要包括小片段基因组 DNA 随机克隆法和磁珠富集法^[15]。谢楠等^[16]利用斑鳢 EST 序列发现 8 439 个 SSR, SSR 出现频率为 19.03%; 朱传坤等^[17]利用磁珠富集法分离获得 162 个乌苏里拟鲮微卫星标记; 曲妮妮等^[18]利用 FIASCO 方法获得了 479 个合浦珠母贝微卫星标记。传统方法开发的微卫星标记虽然在一定程度

上足够用于种群遗传多样性分析以及亲缘关系鉴定等工作,但不能满足遗传连锁图谱构建和特定基因定位等对分子标记需求量较大的研究需要。随着测序成本的降低,平台通量不断扩大,利用二代测序技术对基因组随机测序便可在短期内获得大量的微卫星序列^[19]。Yuan等^[20]对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)采用高通量测序,获得14 094个EST-SSR位点;李薇等^[21]利用HiSeq 2500高通量测序仪对达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)基因组DNA进行随机测序,获得83 000多条SSR序列;孔啸兰等^[22]对长体圆鲀(*Decapterus macrosoma*)进行高通量测序获得58 180个微卫星序列。而本研究利用HiSeq 2500高通量测序仪(Illumina, USA)进行全基因组测序,共获得355 297条斑鳢微卫星序列,这为筛选更多高多态性的微卫星标记及后续的资源养护、良种选育工作提供了重要保障。

目前,微卫星用于评价群体的遗传多样性已有诸多报道,Olsen等^[23]研究发现SSR比线粒体DNA能够更好地揭示阿拉斯加鲱形白鲑(*Coregonus clupeaformis*)种群的遗传结构;Norouzi和Pouekazemi^[24]在利用SSR研究闪光鲟(*Acipenser stellatus*)中发现沿里海海岸线有不同的遗传群体存在;Min等^[25]对淡水贻贝(*Lamprotula leai*)微卫星分析发现近交是影响其位点偏离Hardy-Weinberg平衡的关键因子;陈静等^[26]利用10个微卫星位点在10个日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)群体中检测到平均 N_a 为23.9、平均 H_o 为0.65~0.72、平均 H_e 为0.79~0.88。与上述研究类似,本研究样本数量为28~41,采用20个微卫星位点进行群体分析,群体平均 N_a 介于6.4~14.8、平均 H_o 为0.288~0.662,平均 H_e 为0.52~0.87,其中在斑鳢化州群体中共检测到296个 N_a , H_o 为0.33~0.87, H_e 为0.54~0.95,多态信息含量为0.51~0.94,说明本研究采用的方法可行有效。PIC是衡量微卫星位点多态性高低的指标,Boststein^[27]提出划分标准,PIC>0.5时该位点具有高度多态性;0.25<PIC<0.5时,该位点具有中度多态性;PIC<0.25时,该位点为低度多态性。本研究中,6个斑鳢群体的20个微卫星位点多态信息含量为0.565 5~0.875 0,均高于0.5,表明本实验所选取的位点均属于高度多态性。同时,根据牛东红等^[28]在2010年探究样本数量对遗传多样性指标的影响时指出,当样本数量大于30时遗传多样性指数趋于稳定,表明本研

究选取的样本适用于斑鳢种群遗传多样性的分析,具有较高的可靠性。

杂合度是度量群体遗传变异的最适参数^[29],种群杂合度越高,表明该种群遗传多样性越高,群内变异越大^[30-31],反之亦然。 H_o 与 H_e 相差越多,表明该种群受自然灾害、种内近交以及人为破坏因素影响越大,群体处于遗传不平衡状态;反之,若两者相差越近则表明该种群处于遗传平衡。本研究中,6个斑鳢群体平均 H_o 均小于对应的 H_e ,这与武世雄等^[32]关于大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)遗传多样性的研究结果类似,表明用于本研究的6个野生斑鳢群体均处于遗传不平衡状态。同时,Hardy-Weinberg平衡偏离常数显示,有79.17%的基因座表现为极显著的遗传连锁不平衡,7.5%的基因座表现为显著的遗传不平衡,仅有13.33%的基因座表现为遗传平衡。这可能是由于斑鳢属于非洄游性鱼类,主要分布于水系上游以及湖泊水库等水域,存在近亲交配,且各种群之间相隔较远,因而基因交流减少,造成部分等位基因缺失,从而出现杂合子缺失的现象^[33-34]。同时,本研究中斑鳢各群体 N_e 较少,这可能是由于生存环境的逐渐恶化,如水体污染以及人们的肆意捕捞和鱼类产卵场所遭破坏等原因,导致种群活动区域缩小,有效种群缩小,近交严重,有效等位基因丢失^[35]。

目前,遗传分化系数 F_{ST} 被广泛应用于衡量群体间的遗传分化程度,按照Balloux和Lugon-moulin^[36]在2002年提出的评判标准, $F_{ST}<0.05$ 时表示种群间分化程度弱;0.05< $F_{ST}<0.15$ 时表示分化程度中等;0.15< $F_{ST}<0.25$ 时表示分化程度较大;若 $F_{ST}>0.25$,则表示分化程度极大。本研究中6个斑鳢群体间JH与其他5个群体间的 F_{ST} 值均大于0.15,且除与HZ群体小于0.25外,与另外4个群体间 F_{ST} 值均大于0.25,属于表示江华群体与其他群体分化程度极大;广州、化州、南宁、阳江、邵武群体间的 F_{ST} 值均介于0.05~0.15,属于中等分化程度。AMOVA分析结果表明,6个群体遗传变异主要来源于群体内(84.82%),来源于群体间的变异为15.18%。本研究认为造成这种现象的原因可能是由于群体处于不同自然环境下,当地气候^[37]、水体环境^[38]、河流底泥营养成分^[39]和底层微生物^[40]等均不同,这些因子会直接或者间接地影响种群中某些基因的表达,进而引起种群波

动和生态特征的变化。

本研究结果显示, HZ、YJ 和 SW 3 个群体间遗传距离最近, 在聚类分化时首先聚为一支, 随后与 NN、GZ 群体聚为一支; JH 群体与其他 5 个群体间的遗传距离均较远, 最后 JH 群体才与它们聚为一支。本文分析 JH 与其他种群遗传距离远, 分化程度大的原因可能是 JH 群体的环境因子, 如温度、盐度、饵料和底质等与其他群体不同^[41], 也可能是由于 JH 群体生活的环境相对较封闭, 与其他种群的基因交流较少^[42]; 湖南既有斑鳢也有乌鳢自然分布, 属于由南到北, 由斑鳢向乌鳢转变的过渡区^[43], 在自然条件下可能存在基因交流, 杂交鳢的遗传距离与斑鳢间的遗传距离较斑鳢种群内部更远^[44], 这也可能是 JH 群体分化程度大的原因。NN 与 GZ 群体遗传距离较近, 推测是因为 NN 与 GZ 虽然分别属于西江与北江, 但都属于珠江流域河流, 为天然地理群体的基因交流提供了机会^[45], NN 与 GZ 间的 N_m 值为 1.624 5 (N_m 是评估种群间基因交流的参数, $N_m > 1$, 表示基因交流水平较高) 也佐证了这一点。同时, 杂交鳢可育, 在养殖或流通过程中有可能逃逸到自然水体, 从而造成野生群体的混杂。

4 结论

本研究通过对斑鳢基因组进行高通量测序, 获得了 355 297 条微卫星序列, 与传统方法相比具有明显优势, 将成为微卫星开发的主要手段之一。利用筛选的 20 个高多态性微卫星标记对花都、化州、江华、南宁、阳江和邵武 6 个斑鳢群体进行遗传多样性分析; 结果表明, 6 个群体均有较高的遗传多样性, 且种群间存在中等或高度分化状况。本研究为斑鳢种群管理、养殖亲本遗传改良奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 上海水产大学, 华南师范大学, 等. 广东淡水鱼类志 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1990: 511-514.
- [2] 张新铨, 陈昆慈, 朱新平. 乌鳢、斑鳢及杂交种养殖研究现状 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(22): 132-134.
- [3] OU M, ZHAO J, LUO Q, et al. Characteristics of hybrids derived from *Channa argus*♀×*Channa maculata*♂ [J]. Aquaculture, 2018, 492(1): 349-356.
- [4] 陈薛伟杰, 郭健康, 杨志, 等. 贵州境内 3 个野生大眼鳊群体的

- 形态差异 [J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 34-43.
- [5] 舒璇, 江小璐, 杨华强, 等. 华南地区 7 个大刺鳊野生群体的形态差异分析 [J]. 广州大学学报 (自然科学版), 2017, 16(3): 8-14.
- [6] 张龙岗, 刘羽清, 朱树人, 等. 乌鳢和杂交鳢 4 种同工酶的比较研究 [J]. 长江大学学报 (自科版), 2017, 14(18): 33-36.
- [7] 孙效文, 张晓锋, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用 [J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 689-703.
- [8] 朱冰, 樊佳佳, 白俊杰, 等. 金草鱼与中国 4 个草鱼群体的微卫星多态性比较分析 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(2): 51-58.
- [9] 杨兵, 林琳, 李纯厚, 等. 基于高通量测序的二长棘鲷微卫星标记开发与评价 [J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 116-120.
- [10] HE L, XIE Y N, LU W, et al. Genetic diversity in three red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) lines developed in culture in China [J]. Aquacult Res, 2012, 43(1): 75-83.
- [11] SLABBERT R, BESTER A E, D'AMATO M E. Analyses of genetic diversity and parentage within a south African hatchery of the abalone *Haliotis midae* Linnaeus using microsatellite markers [J]. J Shellfish Res, 2009, 28(2): 369-375.
- [12] XU X J, WANG G Z, ZENG C S, et al. Parentage determination of the mud crab *Scylla paramamosain* using microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2017, 49(1): 217-221.
- [13] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧 [J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18.
- [14] WANG Y K, ZHAO J, LI W, et al. Development of a multiplex microsatellite PCR assay based on microsatellite markers for the Mud Carp, *Cirrhinus molitorella* [J]. J World Aquacult Soc, 2016, 47(2): 277-286.
- [15] 朱立静, 孙中响, 陈淑吟, 等. 磁珠富集法筛选西施舌微卫星序列 [J]. 南方水产科学, 2011, 7(4): 10-15.
- [16] 谢楠, 刘凯, 冯晓宇, 等. 乌鳢和斑鳢 EST 序列微卫星信息分析 [J]. 淡水渔业, 2016, 46(3): 16-22.
- [17] 朱传坤, 潘正军, 王辉, 等. 乌苏里拟鲢微卫星文库的构建及分析 [J]. 水生生物学报, 2017, 41(2): 473-478.
- [18] 曲妮妮, 龚世园, 黄桂菊, 等. 基于 FIASCO 技术的合浦珠母贝微卫星标记分离与筛选研究 [J]. 热带海洋学报, 2010, 29(3): 47-54.
- [19] LEFTEROVA M I, SUAREZ C J, BANNAEI N, et al. Next-generation sequencing for infectious disease diagnosis and management: a report of the association for molecular pathology [J]. JMD, 2015, 17(6): 623-634.
- [20] YUAN W C, HUANG H Z, LI W L, et al. Analysis of EST-SSRs information in *Siniperca chuatsi* transcriptome and detection of polymorphism [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(2): 403-409.
- [21] 李薇, 李久焯, 荆慧芳, 等. 基于高通量测序的达氏鲟微卫星标记筛选 [J]. 动物学杂志, 2017, 52(3): 92-100.
- [22] 孔啸兰, 李敏, 陈作志, 等. 基于 RAD-seq 技术的长体圆鲂二、三核苷酸重复微卫星标记开发与评价 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(3): 97-103.
- [23] OLSEN J B, BROWN R J, RUSS O L, et al. Contemporary

- factors influencing genetic diversity in the Alaska humpback whitefish *Coregonus clupeaformis* complex[J]. J Fish Biol, 2018, 92(4): 1065-1081.
- [24] NOROUZI M, POUEKAZEMI M. Microsatellite DNA markers for analysis of genetic population structure of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) in the north (Volga and Ural Rivers) and South Caspian Sea (Sefidrud and Gorganrud Rivers)[J]. Iran J Fish Sci, 2016, 15(2): 687-700.
- [25] MIN J J, RONG-HUI Y E, ZHANG G F, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of freshwater mussel (*Lamprotula leai*)[J]. Zool Res, 2015, 36(1): 34-40.
- [26] 陈静, 宋光同, 何吉祥, 等. 安徽省 10 个日本沼虾群体遗传多样性微卫星分析 [J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 7-12.
- [27] BOSTSTEIN D. Construction genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [28] 牛东红, 陈慧, 林国文, 等. 缢蛏群体微卫星分析中样本量对遗传多样性指标的影响 [J]. 海洋科学进展, 2010, 18(2): 203-208.
- [29] 乔利英, 袁亚男. 微卫星标记遗传多样性的度量指标及影响因素 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 107-111.
- [30] 赵彦花, 区又君, 温久福, 等. 基于微卫星标记的黄唇鱼遗传多样性研究 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(4): 127-132.
- [31] 邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析 [J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 41-46.
- [32] 武世雄, 姜欣彤, 王伟, 等. 大泷六线鱼 6 个群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(3): 52-60.
- [33] ASTANEI I. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (PALLAS)[J]. Mol Ecol, 2010, 14(6): 1655-1666.
- [34] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析 [J]. 自然科学进展, 2004, 14(3): 333-338.
- [35] 李宏俊. 海湾扇贝微卫星标记的开发及遗传连锁图谱的构建 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2009: 55.
- [36] BALLOUX F, LUGON-MOULIN N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. Mol Ecol, 2002, 11(2): 155-165.
- [37] 鞠培龙. 台湾海峡及其邻近海域四种底层及近底层鱼类生态学特征变化的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014: 59.
- [38] 刘金生. 中华绒螯蟹的生长动态、基因表达与水质环境 (水温、溶氧、pH 及氨氮) 的相关性 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 6-9.
- [39] 蒋玫, 李磊, 沈新强, 等. 底泥浸出液对脊尾白虾抗氧化解毒酶及相关基因表达的影响 [J]. 生态环境学报, 2013, 22(7): 1182-1186.
- [40] 段亚飞, 李健, 李吉涛, 等. 致病性粪肠球菌对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 免疫相关基因表达的影响 [J]. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 148-155.
- [41] 寿鹿, 杜卫国, 陆玮玮. 北草蜥种群间生活史变异的成因分析: 热环境、食物可利用性和体温的岛屿间差异 [J]. 动物学报, 2005, 51(5): 797-805.
- [42] 刘思情, 唐琼英, 李小娟, 等. 基于线粒体细胞色素 b 基因的黑鳍鲷 (*Sarcocheilichthys nigripinnis*) 生物地理学过程分析 [J]. 动物学研究, 2013, 34(5): 437-445.
- [43] 杨四秀. 永州地区斑鳢与乌鳢种质特性比较研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006: 4-7.
- [44] 喻达辉, 朱嘉濠. 珠母贝属 6 个种的 ITS 2 分子标记研究 [J]. 南方水产, 2005, 1(4): 6-12.
- [45] 常城, 韩慧宗, 王腾腾, 等. 单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 微卫星标记开发及 5 个地理种群遗传结构分析 [J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(3): 498-507.