

# 大菱鲆微卫星标记在亲本后代中的分离分析

王广宁<sup>1,2,3</sup>, 马爱军<sup>1,2</sup>, 李 猛<sup>1</sup>, 马得友<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266071; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的养殖群体进行微卫星分析研究, 作者用 70 个微卫星位点在大菱鲆亲本后代中的基因型分离方式进行检测与分析。结果显示, 70 个位点共产生了 12 种分离方式(♀×♂)。70 个微卫星位点中 45 个位点符合孟德尔遗传定律( $P \geq 0.05$ ), 有 25 个位点偏离了孟德尔遗传定律( $P < 0.05$ )。平均等位基因数目为 2.2, 平均有效等位基因数为 1.885。平均期望杂合度和观测杂合度分别为 0.55 和 0.537。多态信息含量为 0.182~0.699, 平均值为 0.361。研究证明这些标记大部分可以用于大菱鲆进一步的图谱构建, QTL 定位和分子标记辅助育种研究。同时对群体的分析表明, 该大菱鲆养殖群体遗传多样性水平较高, 可用于进一步的良好繁育。

**关键词:** 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 微卫星位点; 遗传变异; 基因分离

中图分类号: Q341 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)04-0001-10

doi: 10.11759/hyxx20141028002

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)英文名 Turbot, 属于硬骨鱼纲(Osleichthyes)、鲽形目(Pleuronectiformes)、菱鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 俗称欧洲比目鱼, 国内称为“多宝鱼”<sup>[1]</sup>, 具有生长快、营养价值高、肉味鲜美、性格温顺等优点, 在欧洲的养殖已形成产业化, 是欧洲沿海各国重要的海水养殖对象<sup>[1-3]</sup>。

雷霁霖院士于 1992 年首次将大菱鲆引入中国, 经过多年的研究已形成工厂化养殖模式, 经济效益高, 逐渐成为中国海水鱼类养殖的主要品种<sup>[1, 4-5]</sup>。然而在大菱鲆养殖繁育过程中, 由于亲鱼的选择不够严格, 并且都是近亲交配繁殖, 使得孵化率下降、出苗率降低、生长速度减慢、抗逆性变差、抗病性减弱<sup>[6-7]</sup>等种质退化现象过早出现, 并且退化较严重<sup>[8]</sup>。国内的大菱鲆发展已经到了一个迫切需要改良的阶段<sup>[9]</sup>, 需要从根本上去改善大菱鲆的良种选育工作, 这就需要对其遗传育种展开研究, 国内也已经开始了相关方面的研究。

微卫星分子标记由于具有数量多、多态性高、重复性好和便于 PCR 检测等优点<sup>[10]</sup>, 使得微卫星标记成为遗传学研究使用的主要遗传标记, 并且广泛应用于遗传图谱构建<sup>[11-13]</sup>、遗传多样性分析<sup>[14]</sup>、系谱认证<sup>[15]</sup>等研究领域。在大菱鲆研究中微卫星分子标记的应用也早已展开, 国外的研究开展较早, 西

班牙的 Bouza 等<sup>[16]</sup>用 242 个微卫星标记构建了包括 26 个连锁群的大菱鲆连锁图谱, 2013 年 Hermida<sup>[17]</sup>等又将图谱加密, 构建了包含 24 个群体 487 个标记的遗传连锁图谱。国内顾颖<sup>[18]</sup>等筛选出了一些大菱鲆的微卫星标记, 为进一步了解大菱鲆的基因组织结构特点及良种选育工作提供了帮助; 许可<sup>[19]</sup>等筛选了与大菱鲆生长有关的微卫星位点。但国内大菱鲆的微卫星分子标记的开发仍旧较少, 本实验室的李猛<sup>[20]</sup>在 2013 年用 FIASCO 法和标记初步筛选法开发了 413 对微卫星引物并进行了分析。本实验是从已开发的引物中筛选了 70 对引物, 在后代中进行检测, 分析其分离模式及偏分离检测, 并对群体多样性进行了分析。而在相近物种中的类似研究较少, 刘贤德<sup>[21]</sup>等用 22 个微卫星标记对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的 F1 代分离方式进行了分析, 并进行了生长相关性的分析, 找到了对大黄鱼生长有利的基因型

收稿日期: 2014-10-28; 修回日期: 2014-12-30

基金项目: 国家 863 计划(2012AA10A408-8); 现代农业产业技术体系建设专项资金共同资助(CARS-50-01)

[Foundation: National High-tech Research and Development Program of China (863 Program), No. 2012AA10A408-8; Special Fund for the Industrial Technology System Construction of Modern Agriculture and Countermeasures, No.CARS-50-01]

作者简介: 王广宁(1987-), 男, 山东青州人, 硕士, 主要从事海洋动物遗传育种研究, E-mail: wgning1314@126.com; 马爱军, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-85835103, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

及与有利基因连锁的标记;姜黎明<sup>[22]</sup>使用富集文库-菌落原位杂交方法开发的微卫星标记对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)F1代的分离方式进行了分离分析,为半滑舌鳎微卫星标记的开发提供了帮助。本实验通过对微卫星标记在后代群体中的分析研究,以期为大菱鲆遗传图谱的构建, QTL 定位和分子标记辅助育种提供良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验室 2011 年在烟台天源水产国家级良种场所构建了育种家系,亲鱼为 2008 年实验室构建的家系保留鱼种,2010 年用电子标记标记了同批次的鱼,并进行控温控光,促进性腺发育。2011 年在大菱鲆繁殖周期中的盛期,选取健康活泼、体色正常、性腺发育成熟的大菱鲆作为亲鱼,采用人工采卵受精的方法按照交配设计进行定向交配。交配后选择受精卵量大于 25 mL 做为保留家系,孵化后初孵仔鱼大于 20 000 尾的为保留家系,并分池养殖。本研究选

择以电子标记编号 5000047593 为母本、1000046133 为父本杂交获得的后代家系为检测群体。2012 年随机选取家系中 150 尾个体进行分析,聚丙烯酰胺电泳检测后将疑似非本家系的个体选出并剔除,然后选择基因组 DNA 质量好的 90 个个体并结合 2 个亲本进行 SSR 分析。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA 的提取与检测

实验所用亲本和后代 DNA 全是用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取,提取完后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带,用 NANO DROP1000 分光光度计检测 DNA 浓度及纯度;若符合要求,就稀释至 40 ng/μL,分装, -20℃ 保存备用。

#### 1.2.2 PCR 及检测

对新合成的引物进行退火温度优化,然后通过 PCR 扩增出包括核心序列在内的 DNA 序列,对 PCR 产物变性之后进行 8%PAGE 电泳,最后用银染法分析产物带型。实验所用部分微卫星引物的信息见表 1。

表 1 本实验所用部分微卫星引物的核心序列、引物序列、退火温度和片段长度

Tab. 1 Microsatellite primers, repeat motif sequences, primer sequences, annealing temperature, and fragment lengths used in this study

| 位点名称    | 核心序列                                                                          | 引物序列                     | 退火温度(℃) | 片段长度(bp) |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------|----------|
| L12001F | (GT) <sub>16</sub>                                                            | CTGGCACTTGGATTCTGACC     | 60      | 116      |
| L12001R |                                                                               | GGTGCGGCAAGATGGAGT       |         |          |
| L12002F | (TG) <sub>19</sub>                                                            | CAAAGGCAGATGACAATCAAAC   | 60      | 197      |
| L12002R |                                                                               | ACTCGTAGCCGCTTTCGTC      |         |          |
| L12012F | (CA) <sub>24</sub>                                                            | GGGGATGAACAGGGAGATG      | 61      | 198      |
| L12012R |                                                                               | GGAGAACAGAGGTGAGGAGGC    |         |          |
| L12020F | (GT) <sub>7</sub> (GTGC) <sub>6</sub> AT(GT) <sub>3</sub> GC(GT) <sub>6</sub> | CTGCGAGCATAGTAATGTTTTTC  | 57      | 147      |
| L12020R |                                                                               | CTCCCAAGTAATAATCCCACC    |         |          |
| L12021F | (GT) <sub>6</sub> AT(GT) <sub>20</sub> GC(GT) <sub>3</sub>                    | TCAGCTCCTTGGCACAGAAT     | 55      | 209      |
| L12021R |                                                                               | AACTGATCGGCAACCCACA      |         |          |
| L12028F | (TG) <sub>20</sub>                                                            | TTAGCAATGGCTTACTGAGGT    | 55      | 159      |
| L12028R |                                                                               | TGTTTTGTGAATTTGGTATGTCC  |         |          |
| L12029F | (GT) <sub>4</sub> AT(GT) <sub>14</sub>                                        | ACAACGTGCAGATTTACAGTAGC  | 60      | 253      |
| L12029R |                                                                               | GACAACCTTGGTGAAACAAAATA  |         |          |
| L12034F | (AC) <sub>8</sub>                                                             | TTATCCTGCCCCGTCACCCG     | 60      | 142      |
| L12034R |                                                                               | AACAAATGCGGCAACACGT      |         |          |
| L12040F | (GT) <sub>13</sub> ; (GA) <sub>6</sub> TG(GA) <sub>7</sub>                    | TGCCTGTCAGCCTGTGTC       | 56      | 173      |
| L12040R |                                                                               | TGAGCCTTCCCCTCCATT       |         |          |
| L12046F | (GT) <sub>15</sub>                                                            | CTGACCTCGTGAGTGGTAATCC   | 55      | 254      |
| L12046R |                                                                               | CAGCCAGTGCTTGTGTGC       |         |          |
| L12048F | (ATG) <sub>4</sub> ; (AC) <sub>5</sub> GC(AC) <sub>13</sub>                   | AGAATCAAACCTGAAGTGGGTCTT | 49      | 348      |

续表

| 位点名称    | 核心序列                                                                                                                    | 引物序列                     | 退火温度(℃) | 片段长度(bp) |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------|----------|
| L12048R |                                                                                                                         | CTGCTGGAAGACAAACAAATGAC  |         |          |
| L12053F | (GT) <sub>15</sub>                                                                                                      | GACCTCGTGAGTGGTAATCC     | 55      | 254      |
| L12053R |                                                                                                                         | CAGCCAGTGCCTTGTGTGC      |         |          |
| L12072F | (CA) <sub>4</sub> ; (CA) <sub>4</sub>                                                                                   | GCTGACTGCTTCTGCCTACTGC   | 56      | 242      |
| L12072R |                                                                                                                         | GGCATCTGCGGTCTGACAGG     |         |          |
| L12077F | (GT) <sub>15</sub>                                                                                                      | CGCTCAAGTCACATCCACAG     | 50      | 87       |
| L12077R |                                                                                                                         | AGGGTTTTACAGTATCTGGTTG   |         |          |
| L12078F | (CA) <sub>19</sub>                                                                                                      | GTACATTGTAATGGAGTAGTAAAT | 49      | 163      |
| L12078R |                                                                                                                         | CGATAAGCACCGAGTACAG      |         |          |
| L12079F | (TG) <sub>6</sub> ; (TG) <sub>16</sub> AG(TG) <sub>11</sub> ; (TG) <sub>6</sub> ; (TG) <sub>6</sub> ; (TG) <sub>7</sub> | CAAAACATCGTGTAGACTGAG    | 50      | 290      |
| L12079R |                                                                                                                         | GTGATAGAGGACAAAGGTAAGA   |         |          |
| L12080F | (CA) <sub>22</sub>                                                                                                      | CAGAGGGAATGAAGCGATG      | 53      | 292      |
| L12080R |                                                                                                                         | TGTAAGCGTAGGGTGGGAT      |         |          |
| L12090F | (GT) <sub>5</sub> GC(GT) <sub>7</sub>                                                                                   | TATTCAGGTCCAGGGCACA      | 52      | 150      |
| L12090R |                                                                                                                         | GCAAGCATGGATCGCTGT       |         |          |
| L12093F | (TG) <sub>12</sub> ; (TG) <sub>7</sub>                                                                                  | AGCACTCTGCCACTCTTTCTT    | 52      | 150      |
| L12093R |                                                                                                                         | CTACAGACATAGCGTGAGGTTG   |         |          |
| L12094F | (AC) <sub>32</sub>                                                                                                      | GAACCGGCTGAACGTCAC       | 52      | 142      |
| L12094R |                                                                                                                         | TGTTGTTGTGGCTGGTGC       |         |          |
| L12097F | (GT) <sub>18</sub>                                                                                                      | GCTCAAGTCACATCCACAG      | 49      | 91       |
| L12097R |                                                                                                                         | GGGTTTTACAGTATCTGGTTG    |         |          |
| L12099F | (GTTA) <sub>4</sub>                                                                                                     | TCGTTGGTCAGTAAGTTAGGT    | 48      | 99       |
| L12099R |                                                                                                                         | CAAACAACTCACTAACTCGCT    |         |          |
| L12110F | (AC) <sub>8</sub>                                                                                                       | AAAGAGCGAGATGTTCAAAGA    | 51      | 172      |
| L12110R |                                                                                                                         | TGATCCCGTCCCAAGGTC       |         |          |
| L12113F | (AT) <sub>3</sub> (GT) <sub>14</sub>                                                                                    | GAAGCAGGGACGTCAGG        | 51      | 157      |
| L12113R |                                                                                                                         | TTGAGTCTAAATGGGGCTG      |         |          |

PCR 反应程序: 95℃ 5 min 1 个循环; 95℃ 45 s, 退火温度 50 s, 72℃ 50 s, 30 循环; 72℃ 10 min 1 个循环; 4℃ 保存。

PCR 变性产物电泳是利用的 DYY-10C 电泳仪和 DYCZ-20C 序列分析电泳槽。电泳条件: 电压 1 200 V, 电流 500 mA, 功率 600 W。电泳时间在 3.5 h 左右。然后进行染色显色, 自然晾干, 拍照后保存。

### 1.2.3 统计分析

根据每个个体在玻璃板上的条带位置, 确定基因型, 每个微卫星位点的等位基因根据片段大小依次命名为 A、B、C、D.....。

### 1.2.4 实验群体筛选

用 6 对引物(已知其在双亲中表现出的基因型)对 150 个个体与亲本在 PCR 后同时进行聚丙烯酰胺电泳, 挑出与亲本基因型相差较大的个体, 剔除, 最后挑选 90 个 DNA 质量较好的个体。

用 Popgene32 软件处理数据, 计算各个微卫星位点在 2 个亲本和 90 个后代个体中的等位基因数、有效等位基因数。在计算期望杂合度, 是根据亲本的基因型进行推算, 比如亲本的基因型为 AC×BC, 根据孟德尔遗传分离定律, 子代的基因分型及其比例应该为 AB:AC:BC:CC=1:1:1:1, 期望杂合度为 0.75; 亲本的基因型为 AB×BC, 根据分离定律, 子代的基因分型及其比例为 AB:AC:BB:BC=1:1:1:1, 期望杂合度为 0.75; 但在亲本的基因型为 AA×BB, 子代的基因分型全为 AB, 期望杂合度为 1, 而用 Popgene32 软件计算时, 得到的期望杂合度为 0.5。多态信息含量按 Bostein<sup>[23]</sup>等的公式计算:

$$PIC=1-\sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_j^2 P_i^2$$

其中,  $P_i$  和  $P_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因在群体中

的频率,  $n$  为等位基因数。并用 Excel 的  $\chi^2$  功能对各位点的偏分离情况进行了卡方检测。

2 结果

2.1 微卫星位点在后代群体中的分离

将这 70 个微卫星位点在 2 个亲本和后代 90 个个体中进行检测, 结果(表 1)显示 70 个位点在亲本后代中有 12 种分离方式( $\text{♀} \times \text{♂}$ ):  $\text{AA} \times \text{AB}$ (8 个),  $\text{AB} \times \text{AA}$ (12 个),  $\text{AB} \times \text{AB}$ (20 个),  $\text{AB} \times \text{AC}$ (1 个),  $\text{AB} \times \text{BB}$ (9 个),  $\text{AB} \times \text{BC}$ (4 个),  $\text{AB} \times \text{CD}$ (2 个),  $\text{AC} \times \text{BC}$ (2 个),  $\text{AC} \times \text{AB}$ (1 个),  $\text{BB} \times \text{AB}$ (9 个),

$\text{BC} \times \text{AC}$ (1 个),  $\text{BC} \times \text{AB}$ (1 个)。其中只在母本和子代发生分离的有 21 个, 只在父本和子代发生分离的有 17 个, 双亲和子代中都发生分离的有 32 个。在所检测的 70 个位点中有 45 个的子代个体基因型符合孟德尔遗传分离定律( $P \geq 0.05$ ), 有 25 个位点偏离了孟德尔遗传定律( $P < 0.05$ ), 有 22 个位点严重偏离了孟德尔遗传定律( $P < 0.01$ )。图 1 为 L12046, L12094, L120121, L120211 4 个位点在 2 个亲本和后代 90 个个体中的部分电泳图。70 个位点在后代群体中的分离方式及比例见表 2。

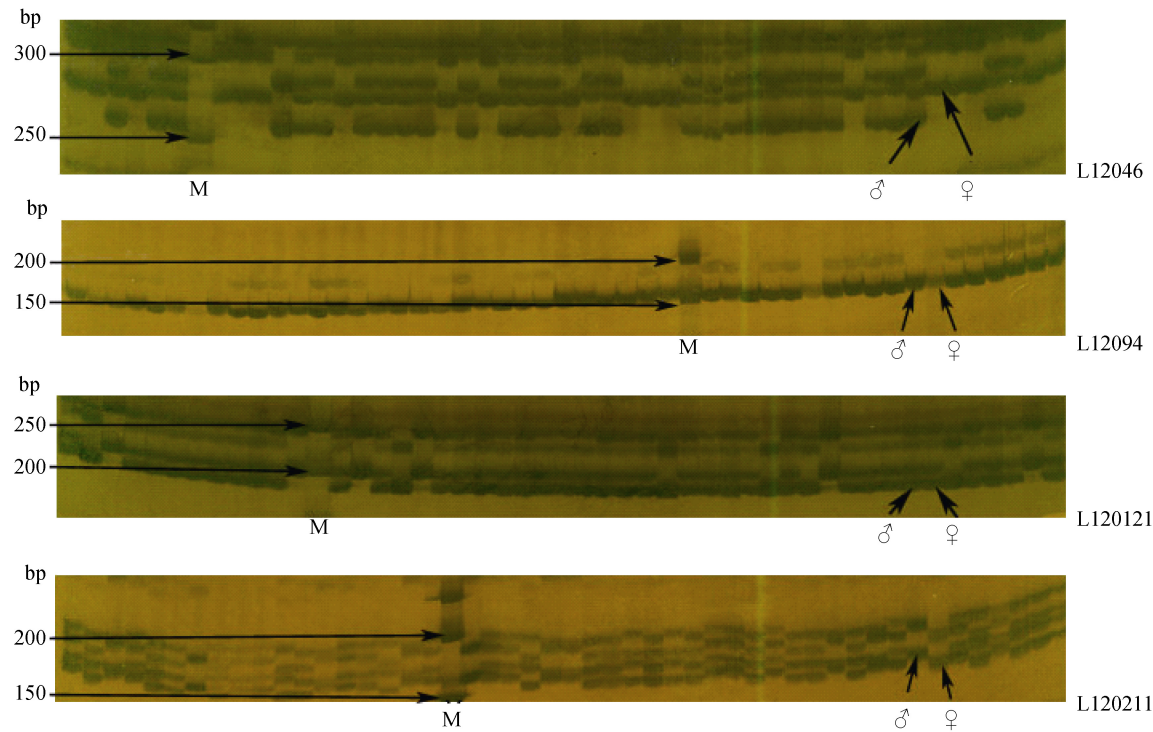


图 1 L12046, L12094, L120121, L120211 4 个位点在后代群体中的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of the four microsatellite loci L12046, L12094, L120121, and L120211 in progeny

表 2 亲本基因型及 70 个位点在后代中的基因型分布

Tab. 2 Parental genotypes and genotype distributions of 70 loci in progeny

| 位点名称   | 亲本基因型 ( $\text{♀} \times \text{♂}$ ) | F1 的基因型分布                              |
|--------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| L12001 | $\text{<AB} \times \text{AB>}$       | $\text{AA: AB: BB}=6: 40: 46$          |
| L12002 | $\text{<AB} \times \text{AB>}$       | $\text{AA: AB: BB}=46: 2: 44$          |
| L12012 | $\text{<AB} \times \text{AB>}$       | $\text{AA: AB: BB}=17: 34: 40$         |
| L12020 | $\text{<BB} \times \text{AB>}$       | $\text{AB: BB}=21: 71$                 |
| L12021 | $\text{<AB} \times \text{BC>}$       | $\text{AB: BB: AC: BC}=16: 28: 18: 28$ |
| L12028 | $\text{<BB} \times \text{AB>}$       | $\text{AB: BB}=49: 43$                 |
| L12029 | $\text{<BB} \times \text{AB>}$       | $\text{AB: BB}=46: 41$                 |
| L12034 | $\text{<AB} \times \text{AB>}$       | $\text{AA: AB: BB}=43: 23: 36$         |
| L12040 | $\text{<AB} \times \text{BB>}$       | $\text{AB: BB}=50: 42$                 |
| L12046 | $\text{<BB} \times \text{AB>}$       | $\text{AB: BB}=54: 38$                 |

续表

| 位点名称   | 亲本基因型 (♀×♂) | F1 的基因型分布                     |
|--------|-------------|-------------------------------|
| L12048 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=26: 41: 25         |
| L12053 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=6: 53: 33          |
| L12072 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=27: 42: 23         |
| L12077 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=34: 19: 34         |
| L12078 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=21: 50: 21         |
| L12079 | <AAxAB>     | AA: AB=44: 48                 |
| L12080 | <ABxBB>     | AB: BB=49: 35                 |
| L12090 | <ABxBB>     | AB: BB=47: 45                 |
| L12093 | <ABxAA>     | AA: AB=47: 44                 |
| L12094 | <ABxAA>     | AA: AB=39: 53                 |
| L12097 | <ABxBC>     | AB: BB: AC: BC=40: 38: 3: 11  |
| L12099 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=29: 58: 5          |
| L12110 | <BBxAB>     | AB: BB=51: 41                 |
| L12113 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=28: 42: 22         |
| L12116 | <ABxBB>     | AB: BB=29: 63                 |
| L12118 | <ACxBC>     | AB: AC: BC: CC=0: 33: 51: 8   |
| L12121 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=24: 59: 9          |
| L12123 | <ABxAA>     | AA: AB=51: 41                 |
| L12138 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=9: 33: 47          |
| L12143 | <ABxBC>     | AB: BB: AC: BC=27: 29: 14: 22 |
| L12144 | <AAxAB>     | AA: AB=51: 39                 |
| L12147 | <ABxAA>     | AA: AB=40: 52                 |
| L12157 | <AAxAB>     | AA: AB=38: 49                 |
| L12159 | <BBxAB>     | AB: BB=45: 47                 |
| L12163 | <ABxAA>     | AA: AB=46: 46                 |
| L12186 | <AAxAB>     | AA: AB=42: 50                 |
| L12191 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=34: 42: 16         |
| L12193 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=29: 35: 28         |
| L12196 | <BBxAB>     | AB: BB=51: 41                 |
| L12211 | <ABxCD>     | AC: BC: AD: BD=22: 28: 17: 25 |
| L12227 | <BBxAB>     | AB: BB=50: 42                 |
| L12245 | <ABxAA>     | AA: AB=50: 42                 |
| L12248 | <ACxBC>     | AB: AC: BC: CC=27: 19: 18: 28 |
| L12251 | <ABxAA>     | AA: AB=41: 51                 |
| L12255 | <ABxCD>     | AC: BC: AD: BD=20: 24: 19: 29 |
| L12258 | <AAxAB>     | AA: AB=57: 35                 |
| L12265 | <AAxAB>     | AA: AB=71: 21                 |
| L12271 | <ABxAA>     | AA: AB=52: 40                 |
| L12283 | <ACxAB>     | AA: AB: AC: BC=27: 29: 14: 22 |
| L12288 | <ABxAA>     | AA: AB=57: 35                 |
| L12290 | <ABxBC>     | AB: BB: AC: BC=33: 23: 18: 18 |
| L12293 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=26: 46: 20         |
| L12294 | <ABxBB>     | AB: BB=47: 45                 |
| L12297 | <ABxAA>     | AA: AB=29: 63                 |
| L12308 | <BBxAB>     | AB: BB=27: 65                 |

续表

| 位点名称   | 亲本基因型 (♀×♂) | F1 的基因型分布                     |
|--------|-------------|-------------------------------|
| L12309 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=27: 41: 24         |
| L12312 | <ABxAC>     | AA: AB: AC: BC=2: 11: 40: 35  |
| L12314 | <BCxAC>     | AB: AC: BC: CC=25: 24: 20: 23 |
| L12322 | <ABxAA>     | AA: AB=50: 42                 |
| L12329 | <ABxBB>     | AB: BB=69: 23                 |
| L12338 | <AAxAB>     | AA: AB=40: 52                 |
| L12349 | <ABxBB>     | AB: BB=49: 42                 |
| L12357 | <ABxAA>     | AA: AB=29: 63                 |
| L12364 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=7: 85: 0           |
| L12379 | <ABxBB>     | AB: BB=44: 48                 |
| L12381 | <ABxBB>     | AB: BB=49: 43                 |
| L12388 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=15: 31: 46         |
| L12396 | <AAxAB>     | AA: AB=38: 53                 |
| L12404 | <BCxAB>     | AB: BB: AC: BC=42: 20: 0: 30  |
| L12412 | <ABxAB>     | AA: AB: BB=23: 36: 33         |

2.2 微卫星位点在后代群体的遗传变异分析

70 个微卫星位点在后代群体中呈现了各不相同的多态性。用 Popgene32 软件分析数据显示, SSR 的等位基因数位 2~4 个, 平均为 2.2 个, 有效等位基因数为 1.254~3.951, 平均有效等位基因数 1.885。按孟德尔遗传分离定律计算, 期望杂合度为 0.5、0.75、

1 共 3 种情况(因亲本基因没有纯合的, 所以本实验中期望杂合度没有为 0 的情况), 平均观测杂合度为 0.537。多态性信息含量(PIC)为 0.182~0.699, 差异较大, PIC 平均值为 0.361。70 个位点具体的杂合度, 多态信息含量, 偏离程度 P, 有效等位基因数等信息见表 3。

表 3 70 个微卫星位点在大菱鲆后代群体中的遗传信息统计

Tab. 3 Genetic information statistics for 70 microsatellite loci in the F1 generation of turbot

| 位点名称   | 等位基因数目(个) | 有效等位基因(个) | PIC 值 | 期望杂合度 | 观测杂合度 | 卡方检验  |
|--------|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| L12001 | 2         | 1.682     | 0.323 | 0.5   | 0.435 | 0     |
| L12002 | 2         | 1.999     | 0.375 | 0.5   | 0.02  | 0     |
| L12012 | 2         | 1.88      | 0.359 | 0.5   | 0.37  | 0.001 |
| L12020 | 2         | 1.254     | 0.182 | 0.5   | 0.228 | 0     |
| L12021 | 3         | 2.441     | 0.523 | 0.75  | 0.674 | 0.1   |
| L12028 | 2         | 1.641     | 0.314 | 0.5   | 0.533 | 0.531 |
| L12029 | 2         | 1.637     | 0.313 | 0.5   | 0.5   | 0.435 |
| L12034 | 2         | 1.934     | 0.366 | 0.5   | 0.25  | 0     |
| L12040 | 2         | 1.655     | 0.317 | 0.5   | 0.543 | 0.402 |
| L12046 | 2         | 1.709     | 0.329 | 0.5   | 0.587 | 0.09  |
| L12048 | 2         | 2         | 0.375 | 0.5   | 0.446 | 0.572 |
| L12053 | 2         | 1.841     | 0.353 | 0.5   | 0.576 | 0     |
| L12072 | 2         | 1.996     | 0.375 | 0.5   | 0.457 | 0.615 |
| L12077 | 2         | 2         | 0.375 | 0.5   | 0.207 | 0     |
| L12078 | 2         | 2         | 0.375 | 0.5   | 0.543 | 0.704 |
| L12079 | 2         | 1.628     | 0.311 | 0.5   | 0.522 | 0.676 |
| L12080 | 2         | 1.704     | 0.328 | 0.5   | 0.533 | 0.056 |
| L12090 | 2         | 1.614     | 0.308 | 0.5   | 0.511 | 0.835 |
| L12093 | 2         | 1.579     | 0.299 | 0.5   | 0.478 | 0.738 |
| L12094 | 2         | 1.695     | 0.326 | 0.5   | 0.576 | 0.14  |
| L12097 | 3         | 1.863     | 0.405 | 0.75  | 0.587 | 0     |

续表

| 位点名称   | 等位基因数目(个) | 有效等位基因(个) | PIC 值 | 期望杂合度 | 观测杂合度 | 卡方检验  |
|--------|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| L12099 | 2         | 1.873     | 0.357 | 0.5   | 0.63  | 0     |
| L12110 | 2         | 1.669     | 0.32  | 0.5   | 0.554 | 0.294 |
| L12113 | 2         | 1.992     | 0.374 | 0.5   | 0.457 | 0.517 |
| L12116 | 2         | 1.362     | 0.23  | 0.5   | 0.315 | 0     |
| L12118 | 3         | 2.473     | 0.526 | 0.75  | 0.913 | 0     |
| L12121 | 2         | 1.948     | 0.368 | 0.5   | 0.641 | 0     |
| L12123 | 2         | 1.53      | 0.29  | 0.5   | 0.445 | 0.294 |
| L12138 | 2         | 1.692     | 0.325 | 0.5   | 0.359 | 0     |
| L12143 | 3         | 2.347     | 0.511 | 0.75  | 0.685 | 0.053 |
| L12144 | 2         | 1.514     | 0.282 | 0.5   | 0.434 | 0.186 |
| L12147 | 2         | 1.682     | 0.323 | 0.5   | 0.565 | 0.207 |
| L12157 | 2         | 1.68      | 0.323 | 0.5   | 0.532 | 0.172 |
| L12159 | 2         | 1.586     | 0.301 | 0.5   | 0.511 | 0.835 |
| L12163 | 2         | 1.6       | 0.305 | 0.5   | 0.5   | 1     |
| L12186 | 2         | 1.655     | 0.317 | 0.5   | 0.543 | 0.402 |
| L12191 | 2         | 1.926     | 0.365 | 0.5   | 0.438 | 0.03  |
| L12193 | 2         | 2         | 0.375 | 0.5   | 0.38  | 0.061 |
| L12196 | 2         | 1.669     | 0.32  | 0.5   | 0.554 | 0.294 |
| L12211 | 4         | 3.94      | 0.699 | 1     | 1     | 0.34  |
| L12227 | 2         | 1.655     | 0.317 | 0.5   | 0.543 | 0.402 |
| L12245 | 2         | 1.544     | 0.29  | 0.5   | 0.457 | 0.402 |
| L12248 | 3         | 2.647     | 0.552 | 0.75  | 1     | 0.294 |
| L12251 | 2         | 1.669     | 0.32  | 0.5   | 0.554 | 0.294 |
| L12255 | 4         | 3.951     | 0.7   | 1     | 1     | 0.462 |
| L12258 | 2         | 1.445     | 0.261 | 0.5   | 0.38  | 0.018 |
| L12265 | 2         | 1.254     | 0.182 | 0.5   | 0.228 | 0     |
| L12271 | 2         | 1.516     | 0.282 | 0.5   | 0.435 | 0.207 |
| L12283 | 3         | 2.544     | 0.537 | 0.75  | 0.707 | 0.053 |
| L12288 | 2         | 1.445     | 0.261 | 0.5   | 0.38  | 0.018 |
| L12290 | 3         | 2.544     | 0.537 | 0.75  | 0.75  | 0.121 |
| L12293 | 2         | 1.992     | 0.374 | 0.5   | 0.5   | 0.671 |
| L12294 | 2         | 1.614     | 0.308 | 0.5   | 0.511 | 0.835 |
| L12297 | 2         | 1.819     | 0.349 | 0.5   | 0.685 | 0     |
| L12308 | 2         | 1.334     | 0.219 | 0.5   | 0.293 | 0     |
| L12309 | 2         | 1.998     | 0.375 | 0.5   | 0.446 | 0.537 |
| L12312 | 3         | 2.877     | 0.579 | 0.75  | 0.935 | 0     |
| L12314 | 3         | 2.703     | 0.559 | 0.75  | 0.75  | 0.885 |
| L12322 | 2         | 1.544     | 0.29  | 0.5   | 0.457 | 0.402 |
| L12329 | 2         | 1.882     | 0.359 | 0.5   | 0.75  | 0     |
| L12338 | 2         | 1.682     | 0.323 | 0.5   | 0.565 | 0.207 |
| L12349 | 2         | 1.649     | 0.316 | 0.5   | 0.533 | 0.452 |
| L12357 | 2         | 1.819     | 0.349 | 0.5   | 0.685 | 0     |
| L12364 | 2         | 1.989     | 0.374 | 0.5   | 0.924 | 0     |
| L12379 | 2         | 1.572     | 0.298 | 0.5   | 0.478 | 0.676 |
| L12381 | 2         | 1.641     | 0.314 | 0.5   | 0.533 | 0.501 |
| L12388 | 2         | 1.796     | 0.345 | 0.5   | 0.337 | 0     |
| L12396 | 2         | 1.703     | 0.328 | 0.5   | 0.576 | 0.106 |
| L12404 | 3         | 2.226     | 0.49  | 0.75  | 0.782 | 0     |
| L12412 | 2         | 1.977     | 0.372 | 0.5   | 0.391 | 0.054 |
| 均值     | 2.2       | 1.885     | 0.361 | 0.55  | 0.537 |       |

### 3 讨论

本实验在计算群体的期望杂合度的时候参考的是刘贤德的计算方法<sup>[21]</sup>,即根据亲本的基因型来推断子代的基因型,然后根据子代的基因型理论分布情况来计算期望杂合度。这与张宁<sup>[24]</sup>、刘瑞成<sup>[25]</sup>等用常用群体分析软件所采用 Nei 氏公式的计算方法是不同的,这两种计算方法的结果有时候一致,有时候不一致。

例如本实验中亲本为 AB×CD 时,使用 Nei 氏公式推断的子代期望杂合度为 0.75,而根据孟德尔分离定律,子代全为杂合,期望杂合度为 1,两种方法结果不一致;亲本为两种不同的纯和体(如 AA×BB),子代全为杂合,期望杂合度为 1,用 Nei 氏公式计算结果为 0.5,结果也不一致。因此对于家系群体,应该根据亲本的基因型,按照孟德尔分离定律来计算期望杂合度<sup>[21]</sup>。70 个微卫星位点的观测杂合度均值为 0.537,说明该群体的杂合度较高,群体的遗传多样性较高。

70 个微卫星位点中有 25 个偏分离( $P<0.05$ ),偏分离比例较大(0.357)。发生偏分离的原因有多种,比如统计数据时,基因型划分不准确,条带读取不够准确<sup>[26]</sup>、研究个体数较少、纯合致死基因的存在<sup>[27]</sup>。本研究中可能是由于国内大菱鲂都是养殖群体,在养殖过程中,没有野生群体血缘的加入,是群体的纯合致死基因纯合几率增大,使得偏分离程度增加。

PIC 的大小能够反映出某一个遗传标记所包含的遗传信息含量,当  $PIC>0.5$  时,表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性;当  $0.5>PIC>0.25$  时,表明该遗传标记能够较为合理的提供遗传信息,而当  $PIC<0.25$  时,表明该遗传标记可提供的遗传信息较差<sup>[28]</sup>。70 个位点中  $PIC>0.5$  的有 10 对,有 58 个在  $0.5>PIC>0.25$  的范围之内,只有两个位点 L12020 和 L12265 的  $PIC<0.25$ ,这说明 70 个微卫星位点提供的遗传信息较丰富,同时也表明该群体总体的遗传多样性水平还是较高的。从以上分析可以看出,这些微卫星位点大部分还是能够满足大菱鲂进一步的遗传学研究的,为大菱鲂的图谱构建, QTL 定位和分子标记辅助育种的研究提供了较好的分子标记。对群体的分析表明,该大菱鲂养殖群体虽然出现了一定程度的退化,但是遗传多样性水平还比较高,可用于进一步的良种繁育。

### 参考文献:

- [1] 雷霖霖. 海水养殖新品种介绍——大菱鲂[J]. 中国水产, 2000, 293(4): 2.  
Lei Jilin. A new marine culture species *Scophthalmus maximus*[J]. China Fisheries, 2000, 293(4): 2.
- [2] 雷霖霖, 刘新富. 大菱鲂引进养殖的初步研究[J]. 现代渔业信息, 1995, 10(11): 1-3.  
Lei Jilin, Liu Xinfu. An primary study on culture of turbot, *Scophthalmus maeoticus* L.[J]. Journal of Modern Fisheries Information, 1995, 10(11): 1-3.
- [3] 雷霖霖, 马爱军, 刘新富, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)胚胎及仔稚幼鱼发育研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 9-18.  
Lei Jilin, Ma Aijun, Liu Xinfu, et al. Study on the development of embryo, larval and juvenile of turbot *Scophthalmus maximus* L.[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2003, 34(1): 9-18.
- [4] 马爱军, 陈四清, 雷霖霖, 等. 大菱鲂产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(1): 75-82.  
Ma Aijun, Chen Siqing, Lei Jilin, et al. Effects of spawning season on biological and biochemistry characteristic of eggs of turbot *Scophthalmus maximus* L.[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2002, 33(1): 75-82.
- [5] 纪利芹, 蒋克勇, 韩龙江, 等. 连续降温对大菱鲂成鱼代谢机能的影响[J]. 海洋科学, 2014, 38(5): 46-53.  
Ji Liqin, Jiang Keyong, Han Longjiang, et al. Effect of continuous cooling on metabolic function of adult *Scophthalmus maximus* L.[J]. Marine Sciences, 2014, 38(5): 46-53.
- [6] 秦蕾, 王印庚, 阎斌伦. 大菱鲂微生物性疾病研究进展[J]. 水产科学, 2008, 27(11): 598-602.  
Qin Lei, Wang Yingeng, Yan Binlun. Advances in research on diseases of turbot *Scophthalmus maximus* affected by microorganisms[J]. Fisheries Science, 2008, 27(11): 598-602.
- [7] 王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲂主要疾病及防治技术[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 61-68.  
Wang Yingeng, Zhang Zheng, Qin Lei, et al. The main diseases of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and their prevention and treatment[J]. Progress In Fishery Sciences, 2004, 25(6): 61-68.
- [8] 雷霖霖. 海水养殖鱼类品种引进的问题与建议[J]. 中国水产, 2002, 2: 63-65.  
Lei Jilin. Problem and suggestion of introducing species for marine culture[J]. China Fisheries, 2002, 2: 63-65.
- [9] 杨德利, 曾鸣谦. 大菱鲂养殖收益影响因素实证研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(10): 170-172.  
Yang Deli, Zeng Mingqian. Empirical study on influence factors of turbot cultivation profit[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(10): 170-172.



- [10] 彭艳辉, 骆剑, 尹绍武, 等. 波纹唇鱼微卫星分子标记的筛选及适用性分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(5): 109-116.  
Peng Yanhui, Luo Jian, Yin Shaowu, et al. Screening and suitability analysis of microsatellite markers in *Cheilinus undulatus*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(5): 109-116.
- [11] Jiang L, Chu G, Zhang Q, et al. A microsatellite genetic linkage map of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Genomics, 2013, 9: 17-23.
- [12] Shen X Y, Kwan H Y, Thevasagayam N M, et al. The first transcriptome and genetic linkage map for Asian arowana[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(3): 622-635.
- [13] Zheng X, Kuang Y, Zhang X, et al. A genetic linkage map and comparative genome analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellites and SNPs[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2011, 286(3-4): 261-277.
- [14] 韩斐斐, 张继彪, 李莉, 等. 虾夷扇贝养殖群体及其子代的遗传多样性分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(9): 1-8.  
Han Feifei, Zhang Jibiao, Li Li, et al. Genetic diversity in two-generation of cultured Japanese scallop (*Patinopecten (Mizuhopecten) yessoensis*) populations[J]. Marine Sciences, 2012, 36(9): 1-8.
- [15] 刘磊, 李健, 刘萍. 基于微卫星标记的三疣梭子蟹家系系谱认证[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(Z2): 38-44.  
Liu Lei, Li Jian, Liu Ping. Parentage determination of *Portunus trituberculatus* in family establishment based on microsatellite DNA markers[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(Z2): 38-44.
- [16] Bouza C, Hermida M, Pardo B G, et al. A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Genetics, 2007, 177: 2457-2467.
- [17] Hermida M, Bouza C, Fernández C, et al. Compilation of mapping resources in turbot (*Scophthalmus maximus*): A new integrated consensus genetic map[J]. Aquaculture, 2013, 414: 19-25.
- [18] 顾颖, 郭忠宝, 谷晶晶, 等. 大菱鲆微卫星标记的分离及其多态性位点检测[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(4): 366-370.  
Gu Ying, Gu Zhongbao, Gu Jingjing, et al. Isolation of novel microsatellite markers from genome library and SSR polymorphic loci identification in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(4): 366-370.
- [19] 许可, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)生长性状相关的微卫星标记筛选[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 577-583.  
Xu Ke, Ma Aijun, Wang Xinan, et al. Microsatellite molecular markers and the correlation to growth trait of *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(5): 577-583.
- [20] 李猛, 马爱军, 岳亮, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)微卫星序列的开发与分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1365-1371.  
Li Meng, Ma Aijun, Yue Liang, et al. Isolation and analysis of microsatellite markers in the genome of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1365-1371.
- [21] 刘贤德, 韦信键, 蔡明夷, 等. 大黄鱼 22 个微卫星标记在 F1 家系中的分离方式及与生长性状的相关分析[J]. 水产学报, 2012, 36(9): 1322-1329.  
Liu Xiande, Wei Xinjian, Cai Mingyi, et al. The segregation patterns of 22 microsatellite markers in an F1 family of large yellow croaker(*Larimichthys crocea*) and correlation analysis with growth-related traits[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(9): 1322-1329.
- [22] 姜黎明, 于海洋, 张全启, 等. 半滑舌鳎微卫星标记的开发及其在 F1 家系中分离方式分析[J]. 中国水产科学, 2012, 18(6): 1384-1391.  
Jiang Liming, Yu Haiyang, Zhang Quanqi, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and an analysis of segregation in the F1[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 18(6): 1384-1391.
- [23] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American journal of human genetics, 1980, 32(3): 314.
- [24] 张宁, 杨官品. 褶皱臂尾轮虫微卫星的分离和遗传多样性分析[J]. 海洋湖沼通报, 2014, 1: 17.  
Zhang Ning, Yang Guanpin. Isolation of microsatellites of *Brachionus Plicatilis* and determination of genetic diversity of a culturing population[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2014, 1: 17.
- [25] 刘瑞成, 张富铁, 但胜国, 等. 宽口光唇鱼微卫星位点的筛选与特征分析[J]. 四川动物, 2013, 32(2): 161-166.  
Liu Ruicheng, Zhang Futie, Dan Shengguo, et al. Isolation and characterization analysis of microsatellite loci in *Acrossocheilus monticola*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2013, 32(2): 161-166.
- [26] Sibov S T, Lopes De Souza Jr C, Garcia A A, et al. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation[J]. Hereditas, 2003, 139(2): 96-106.
- [27] 张正睿, 王兴莲, 张全启. ISSR 标记在牙鲆(♀)×圆斑星鲽(♂) 杂交子代中的分离方式[J]. 海洋湖沼通报, 2014, 2: 110-117.  
Zhang Zhengrui, Wang Xinglian, Zhang Quanqi. Polymorphism and segregation of ISSR markers in the hybrids between *Paralichthys Olivaceus* (♀) and *Verasper Variegatus* (♂) [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2014, 2: 110-117.
- [28] 熊美华, 史方, 徐念, 等. 中华倒刺鲃微卫星标记筛选及特征分析[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(1): 40-44.  
Xiong Meihua, Shi Fang, Xu Nian, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Spinibarbus sinensis*(Bleeker)[J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(1): 40-44.

# Separation and analysis of turbot microsatellite markers in progeny

WANG Guang-ning<sup>1, 2, 3</sup>, MA Ai-jun<sup>1, 2</sup>, LI Meng<sup>1</sup>, MA De-you<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. Shanghai Ocean University, College of Fisheries and Life Science, Shanghai 201306, China)

**Received:** Oct. 28, 2014

**Key words:** turbot; microsatellite loci; genetic variation; gene isolation

**Abstract:** To evaluate the farmed turbot population using microsatellite markers, we analyzed the segregation patterns of genotypes constituted by 70 microsatellite loci in turbot parents and their progeny. Results revealed that a total of 12 patterns were detected through sexual hybridization ( $\text{♀} \times \text{♂}$ ). A total of 45 loci were found to adhere to the Mendel's law of inheritance ( $P \geq 0.05$ ), whereas the remaining 25 deviated from the law ( $P < 0.05$ ). The average number of alleles and effective number of alleles were 2.2 and 1.885, respectively. The average expected and observed heterozygosities were 0.55 and 0.537, respectively. The range of polymorphic information content was between 0.182 and 0.699, with an average of 0.361. These results demonstrate that most of these markers will be useful for future progress in genetic breeding in turbot and the farmed turbot population with a high level of genetic diversity can be used for the further breeding of improved varieties.

(本文编辑: 谭雪静)