

斜带石斑鱼不同地理群体遗传变异的微卫星分析

王家祺, 郭 丰, 丁少雄, 王 军

(厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 筛选 5 对可分析引物对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)台湾群体和广东群体的 DNA 多态性进行分析。根据电泳检测结果, 平均每个引物获得 4.2 个等位基因, 未发现群体的特异位点。获得 2 个群体平均观测杂合度(H_o)分别为 0.672 1 和 0.682 6, 平均期望杂合度(H_e)分别为 0.647 9 和 0.544 4, 两群体间的遗传分化系数(F_{ST})为 0.011 0。统计结果表明, 2 个群体有着较高的遗传变异性, 群体间的遗传分化程度处于多数海水鱼类的平均水平。

关键词: 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*); 微卫星; 遗传变异

中图分类号: Q31

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)11-0060-05

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822))属鲈形目(Percitormes)、鲈亚目(Percoidei)、鲈科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*)。斜带石斑鱼为暖水性礁栖鱼类, 分布于印度-西太平洋区, 西至非洲东岸、红海, 东至西太平洋, 北至日本南部, 南至澳洲, 在中国主要见于台湾海峡和南海海域^[1]。

微卫星 DNA 标记具有突变率高、共显性好、多态信息容量高、特异性的 PCR 扩增、引物通用性好、技术难度低等特点, 是分析和评估种群多态性的有效方法。鉴于野生斜带石斑鱼资源量的不断衰减^[2]及目前多数人工繁育种类出现的养殖群体遗传多样性下降、养殖群体因逃逸等对野生群体造成基因污染的状况, 对其开展遗传背景调查具有一定的理论意义。作者利用微卫星分子标记方法对斜带石斑鱼台湾群体和广东群体遗传多样性进行研究, 可为斜带石斑鱼遗传结构的跟踪检测及其资源的进一步开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集及基因组 DNA 提取

斜带石斑鱼台湾群体和广东群体样本分别采自福建省漳浦县石斑鱼鱼种场(60 尾, 受精卵购自台湾省屏东县佳冬乡鱼苗场)和广东省大亚湾水产试验中心(48 尾), 样本均为野生斜带石斑鱼人工繁殖子一代, 每一群体取 46 个样品用于分析。基因组 DNA 提取参照 Sambrook 等^[3]的方法略作修改。

1.2 PCR 引物的筛选

参考 Chapman 等^[4]和 Zatcoff 等^[5]对 2 种石斑鱼小鳞喙鲈(*Mycteroperca microlepis*)和博氏喙鲈(*Mycteroperca bonaci*)的微卫星分析所用引物, 对斜带石斑鱼进行扩增检验, 筛选出 5 对可分析引物, 引物序列见表 1。

收稿日期: 2009-07-05; 修回日期: 2009-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40576064)

作者简介: 王家祺(1982-), 男, 福建厦门人, 硕士研究生, 从事海洋鱼类种质资源与遗传生化方面的研究, 电话: 0592-2516052, E-mail: xmuceo@hotmail.com; 王军, 通信作者, 电话: 0592-2182986, E-mail: junwang@xmu.edu.cn

表 1 微卫星分析的上游、下游引物和重复单位
Tab. 1 The forward and reverse primers, repeat unit of microsatellite

引物	序列(5'-3')	重复单位	文献
GAG007	F: CTG TAA TAG ACA ACC CAC TGT AC	GT	[3]
	R: CCT GTA GCA TCT TCA CTA GCT GGA G		
GAG038	F: CCC CAC CTC CCT TAA CA P	GT	[3]
	R: GCT GAA TTG AGG AAA TGA G		
Mbo061	F: TGA AGA ATG TCA GAT ATT TTG TGG TG	AC	[4]
	R: TCC CAA GAG TGT TGA AGT TAT AGG		
Mbo066	F: CGC ATG TTT GTA AGA ACA GGA AG	GT	[4]
	R: GCT TCA CTC TTG GGT TGT TGG		
Mbo088	F: TGA ACA CCT TCA CAA TAC TTT TCG	GT	[4]
	R: TTG AGT ATA CCA GCA GTT GAA CAT C		

1.3 PCR 扩增

扩增反应在 PE9700 型 PCR 仪上进行, Taq 酶及缓冲液购自 Takara 公司。反应体积为 25 μ L, 其中含 10 $\times$ PCR buffer(Mg²⁺ free) 2. 5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 2 μ L, 25 pmol 引物各 1 μ L, 2. 5 mmol/L dNTP 1 μ L, DNA 模板约 100 ng, Taq 酶 1 U, 无菌 ddw 补足 25 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ (93 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 53 $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 1 min) $\times$ 30 cys $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增产物变性后在含 7 mol/L 尿素的 6% 丙烯酰胺凝胶上, 以 Biomatra 高压电泳仪 50 W 恒功率电泳分离, AgNO₃ 染色并拍照。

1.4 数据分析方法

群体平均杂合度的观测值(H_o) = $\sum H_o' / n$, 其中 H_o' = 杂合子观测值/观察个体的总数; 群体的平均杂合度的预期值(H_e) = $\sum (1 - \sum X_i^2) / n$, X_i 为 X 种群的第 i 个等位基因的频率, n 为所测位点的总数^[6]; 每个多态位点的基因型频率的 Hardy-Weinberg 平衡拟合度用卡方(X^2)一致性检验, 得到概率 P 值。 $X^2 = \sum [(O - E)^2 / E]$, O 和 E 分别为观察到和预期的基因型个体数。根据 Nei^[7, 8] 的计算公式, 遗传一致度 $I = \sum [\sum X_i Y_i / (\sum X_i^2 \sum Y_i^2)^{1/2}] / n$, 遗传距离 $D = -\ln I$, X_i 和 Y_i 分别为 X 及 Y 种群的第 i 个等位基因频率, n 为所测位点总数。根据 Nei^[8] 提出的公式: $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$, F_{IT} 和 F_{IS} 分别表示总群体和亚群体中的两个结合配子之间的相

关系数, 以基因型的实际频率和理论频率的离差表示, F_{ST} 则表示随机取自每个亚群体 2 个配子间的相互关系, 用于测量亚群体间的遗传分化程度。根据 Nei^[9] 的公式, 通过 H_o' , H_s 和 H_T 来计算杂合性基因多样度的比率 $F_{ST} F_{IS} = (H_s - H_o) / H_s$, $F_{IT} = (H_T - H_o) / H_T$, $F_{ST} = (H_T - H_s) / H_T$, H_o , H_s 和 H_T 分别为某一位点群体内观察杂合度、预期杂合度(代表各群体内的基因多样性)和期望总杂合度(代表总体基因多样性)。

2 结果

经电泳检测, 每对引物扩增出 3~6 个等位基因, 共 21 个, 平均每个引物获得 4. 2 个等位基因, 未发现群体的特异位点。

2.1 群体内遗传变异

根据各个微卫星位点的等位基因频率和基因型频率, 分别计算了各位点的观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)。台湾群体各位点的 H_o 为 0. 500 0~0. 869 6, 平均 0. 672 1; 广东群体 H_o 为 0. 456 5~0. 956 5, 平均 0. 682 6。台湾群体各位点的 H_e 为 0. 506 9~0. 737 0, 平均 0. 647 9; 广东群体 H_e 为 0. 476 6~0. 804 1, 平均 0. 544 4。两个群体均显示较高的遗传变异性, 同时广东群体观测值与期望值的差别相对台湾群体显著(表 2)。各多态位点 Hardy-Weinberg 平衡的卡方(X^2)检验结果见表 3。

表 2 各位点的遗传变异
Tab.2 Genetic variability at each locus

引物	等位基因数	H_o		H_e	
		台湾群体	广东群体	台湾群体	广东群体
GAG007	5	0.686 4	0.608 7	0.673 9	0.692 6
GAG038	3	0.869 6	0.782 6	0.635 2	0.515 1
Mbo061	6	0.500 0	0.608 8	0.737 0	0.804 1
Mbo066	3	0.717 4	0.456 5	0.506 9	0.476 6
Mbo088	4	0.587 0	0.956 5	0.686 4	0.748 8
平均	4.2	0.672 1	0.682 6	0.647 9	0.544 4

表 3 群体各位点的卡方(X^2)检验
Tab.3 Contingency X^2 analysis with significance level (P)

位点	X^2 值		自由度	P	
	台湾群体	广东群体		台湾群体	广东群体
GAG007	13.642 5	12.382 9	10	0.189 9	0.260 2
GAG038	9.186 6	12.799 3	3	0.026 9	0.005 1
Mbo061	28.712 4	37.820 1	15	0.017 5	0.010 0
Mbo066	7.912 0	6.383 2	3	0.047 9	0.094 4
Mbo088	5.260 8	22.302 4	6	0.510 8	0.011 0

2.2 群体间遗传差异

计算得两群体间的遗传相似系数 $I=0.951\ 2$, 遗传距离 $D=0.050\ 0$ 。各位点的 F -统计量分析结果见表 4。可以看出,各位点的 F_{IS}, F_{IT}, F_{ST} 有较大差别, F_{IS} 变化范围为 $-0.294\ 9\sim 0.223\ 7$, 平均 $-0.052\ 1$; F_{IT} 变化范围 $-0.293\ 4\sim 0.230\ 3$, 平均 $-0.040\ 5$; 各位点的 F_{ST} 变化于 $0.001\ 2$ 和 0.240 之间, 总体平均 $0.011\ 0$ 。

表 4 各位点的 F -统计量分析
Tab.4 F -statistics analysis of each locus

位点	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
GAG007	0.025 4	0.048 7	0.024 0
GAG038	$-0.294\ 9$	$-0.293\ 4$	0.001 2
Mbo061	0.223 7	0.230 3	0.008 4
Mbo066	$-0.048\ 0$	$-0.031\ 1$	0.016 2
Mbo088	$-0.203\ 2$	$-0.195\ 6$	0.006 3
平均	$-0.052\ 1$	$-0.040\ 5$	0.011 0

3 讨论

3.1 群体内的遗传变异

台湾和广东群体的平均杂合度 H_e 分别为 $0.647\ 9$ 和 $0.544\ 4$, 显示较高的遗传变异性。许多海水鱼类的微卫星检测也普遍获得较高杂合度, Norris 等^[10]对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的检测得 H_e 为 0.70 ; Perez-Enriquez 等^[11]报道了赤鲷 (*Pagrus major*) 的 H_e 为 0.87 ; Zatcoff 等^[5]报道了不同群体博氏喙鲈 (*Mycteroperca bonaci*) 的 H_e 为 $0.637\sim 0.876$ 。DeWoody^[12]对 12 种海水鱼微卫星的分析, 获得了平均 H_e 为 0.77 的结果。在对石斑鱼属鱼类的检测中也同样呈现出较高的杂合度。Zhao 等^[13]通过建立七带石斑 (*Epinephelus septemfasciatus*) 的微卫星富集文库测得 H_e 为 $0.28\sim 0.76$ 。Zhu 等^[14]报道了斑鳃棘鲈 (*Plectropomus maculatus*) H_e 平均为 0.76 。Zeng 等^[15]报道了鞍带石斑 (*Epinephelus lanceolatus*) 的 H_e 为 $0.185\sim 0.801$ 。王登玉等^[16]通过测定来自 3 个不同地理群体的斜带石斑鱼线粒体细胞色素 b 的部分基因序列, 发现台湾群体多态性最高(其余两个为海南和广东群体)。作者的检测结果与上述报道处于同一水平。

各位点卡方(X^2)检验所得概率(P)的出现显著差异,台湾群体为 0.017 5~0.510 8,广东群体 0.005 1~0.260 2,一些位点 $P<0.05$,也即出现偏离 Hardy-Weinberg 平衡的现象,同时相对而言广东群体偏离随机交配更为明显。一些其它鱼类的研究中也发现类似现象,甚至在不同位点同时出现 0 和 1 的极端值^[17,18],这也应该与微卫星的高变异率有关。

3.2 群体间的差异

多数文献应用 F -统计量(也可称遗传分化系数)评估群体间的差异。Norris 等^[10]对大西洋鲑的群体分化研究得 $F_{ST}=0.057$;De-Innocentiis 等^[17]对地中海不同区域东大西洋石斑鱼(*Epinephelus marginatus*)的分析得 $F_{ST}=0.018$;此外还有欧洲黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)为($F_{ST}=0.007$,García de León 等^[19]);美国东南沿岸的小鳞喙鲈(*Mycteroperca microlepis*)($F_{ST}=0.008$,Chapman 等)^[4];欧洲无须鳕(*Merluccius merluccius*)($F_{ST}=0.013$,Lundy 等)^[20],Antoro 等^[21]对来自泰国和印尼不同群体的斜带石斑鱼分析得 $F_{ST}=0.074$ 。王登玉等^[16]在其研究中也发现斜带石斑鱼各群体间均呈现显著的遗传分化。

作者检测得到两群体间的 $F_{ST}=0.011 0$,与上述调查处于同一水平。由于目前还没有根据 F_{ST} 值评价群体分化程度的统一标准,故只能判断台湾和广东群体间的遗传分化程度处于多数海水鱼类的平均水平。

另外,从 Nei 氏遗传相似性和遗传距离的结果($I=0.951 2$, $D=0.050 0$)看,其遗传差异应该也是由微卫星较高的变异率所引起。

总之,根据上述微卫星的分析所得结果,斜带石斑鱼台湾和广东群体尚保留中等程度的遗传变异性,而两者的遗传差异可能较小。

虽然该方法未检测到特别低的变异性,但并不表示能乐观看待其种质资源的变化。因为以往的研究表明,数量处于不断下降以及性别比例失调的种,其群体结构较容易出现不稳定性现象,尤其石斑鱼类都具有较长的世代时间,遗传变异下降趋势的检测在时间上往往具有滞后性;另外样本采集的数量、分布范围等也都会对结果产生影响,偶尔的检测不排除出现假象的可能性。因此许多学者认为应通过对研究对象的跟踪检测以评估其遗传变异性的变化。

参考文献:

[1] Sadovy Y, Cornish A S. Reef Fishes of Hong Kong

[M]. Hong Kong: Hong Kong University Press, 2000.

- [2] Morris A V, Roberts C M, Hawkins J P. The threatened status of groupers(*Epinephelus*) [J]. **Biodiversity and Conservation**, 2000, 9: 919.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbour Press, 1989. 463-468.
- [4] Chapman R W, Sedberry G R, Koenig C C, *et al.* Stock identification of gag, *mycteroperca microlepis*, along the Southeast Coast of the United States [J]. **Mar Biotechnol**, 1999, 1: 37-146.
- [5] Zatzoff M S, Ball A O, Chapman R W. Characterization of polymorphic microsatellite loci from black grouper, *Mycteroperca bonaci* (Teleostei: Serranidae) [J]. **Mol Ecol Notes**, 2002, 2: 217-219.
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. **Genetics**, 1978, 89: 583-590.
- [7] Nei M. Genetic distance between populations [J]. **Amer Natu**, 1972, 106: 283-292.
- [8] Nei M. F-statistics and analysis gene diversity in subdivided populations [J]. **Ann Human Genet**, 1977, 41: 225-233.
- [9] Nei M, Kumar S. 分子进化与系统发育 [M]. 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍, 等译. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [10] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic *Salmon salmo salar* population [J]. **Aquaculture**, 1999, 180: 247-264.
- [11] Perez-Enriquez R, Takagi M, Taniguchi N. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers [J]. **Aquaculture**, 1999, 173: 413-423.
- [12] DeWoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals [J]. **J Fish Biol**, 2000, 56: 461-473.
- [13] Zhao Lili, Shao Changwei, Liao Xiaolin, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) and cross-species amplification [J]. **Conservation Genetics**, 2009, 3: 627-629.
- [14] Zhu Z Y, Lo L C, Lin G, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from red coral grouper (*Plectropomus maculatus*) [J]. **Molecular Ecology Notes**, 2005, 3: 579-581.
- [15] Zeng Huasong, Ding Shaoxiong, Wang Jun, *et al.* Characterization of eight polymorphic microsatellite lo-

- ci for the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus* Bloch) [J]. **Molecular Ecology Resources**, 2008, 4: 805-807.
- [16] 王登玉, 丁少雄, 郭丰, 等. 中国东南近海斜带石斑鱼群体的地理分化和遗传结构研究 [J]. 高技术通讯, 2008, 3: 324-329.
- [17] De-Innocentiis S, Sola L, Cataudella S, *et al.* Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea [J]. **Mol Ecol**, 2001, 10: 2 163-2 175.
- [18] Gold J R, Pak E, DeVries D A. Population structure of king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) around peninsular Florida, as revealed by microsatellite DNA [J]. **Fish Bull**, 2002, **100**(3): 491-509.
- [19] García de León F J, Chikhi L, Bonhomme F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural population of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) [J]. **Mol Ecol**, 1997, 6: 51-62.
- [20] Lundy C J, Moran P, Rico C, *et al.* Macrogeographic population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish [J]. **Mol Ecol**, 1999, 8: 1889-1898.
- [21] Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. **Marine Biotechnology**, 2006, 1: 17-26.

Genetic diversity of different geographical stocks of *Epinephelus coioides* by microsatellite DNA

WANG Jia-qi, GUO Feng, DING Shao-xiong, WANG Jun

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Jul. , 5, 2009

Key words: *Epinephelus coioides*; microsatellite; genetic diversity

Abstract: The microsatellite DNA was used to evaluate genetic diversity and genetic differentiation in two geographical stocks of *Epinephelus coioides* from Taiwan and Guangdong. Altogether 5 primers were assessed in 46 individuals in each stock by analyzing the heterozygosity, Hardy-Weinberg balance deflection index, genetic distance, genetic differentiation. The result showed that the average number of alleles in each microsatellite locus was 4.2, the average observed heterozygosity (H_o) of two stocks was 0.672 1 and 0.682 6, the average expected heterozygosity (H_e) was 0.647 9 and 0.544 4 respectively, and genetic differentiation (F_{ST}) was 0.011 0. It seemed that these two geographical stocks of *E. coioides* still kept high genetic diversity, and the genetic differentiation among stocks was close to the average level of marine fish.

(本文编辑:刘珊珊)