

微卫星标记对中国引进加州鲈养殖群体遗传多样性的分析

梁素娴^{1,2} 孙效文³ 白俊杰¹ 高俊生³

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广州 510380;

2. 大连水产学院, 大连 116023; 3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘要:为了解我国引进加州鲈养殖群体的种群遗传结构和种质资源现状, 本文发展了加州鲈的微卫星标记。用磁珠富集法获得加州鲈微卫星标记 267 个, 设计并合成了 85 对微卫星引物对加州鲈的基因组进行遗传多样性分析, 从中筛选出 18 对并网上查询获得 3 对共 21 对引物对加州鲈的基因组 DNA 进行扩增。PCR 扩增产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶中分离, 硝酸银染色, 经紫外成像后对电泳条带进行统计分析。计算得到三个群体的平均等位基因数分别为 2.3、2.3 和 2.1; 多态信息含量 (PIC) 为 0.0906—0.7480; 平均杂合度观测值分别为 0.384、0.396 和 0.356; 杂合度期望值为 0.375、0.403 和 0.368。统计结果初步表明 3 个不同群体平均杂合度处于中等偏低水平, 遗传多样性不高。

关键词:加州鲈; 微卫星; 多态性; DNA

中图分类号: Q344+.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)05-0694-07

加州鲈鱼 (*Micropterus salmoides*) 原名大口黑鲈 (Largemouth bass), 属鲈形目 (*Perciformes*), 太阳鱼科 (*Centrarchidae*), 黑鲈属 (*Micropterus*), 原产美国加利福尼亚州密西西比河水系, 是一种肉质鲜美、生长快、易起捕、适温较广的名贵肉食性鱼类。加州鲈自 1983 年引进我国广东, 现已推广到全国各地, 成为我国重要的淡水养殖品种之一。但是, 引种 20 多年来有的苗种生产单位不注重亲本留种需遵守的操作规程, 亲本数量太少且没有定期从原产地补充、更换, 可能导致加州鲈遗传多样性降低和种质质量下降。因此, 很有必要对我国现有加州鲈的种群结构、遗传多样性现状进行分析。

微卫星标记, 亦称作简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSRs), 跟其他遗传分子标记相比, 微卫星 DNA 标记不仅具有很好的可重复性, 而且能够提供丰富的多态位点及基因座位杂合度和纯合度等遗传信息, 是分析和评估种群多态性的有效方法^[1]。目前, 微卫星标记在群体遗传结构、基因定位和 QTLs 分析等方面得到广泛应用^[2,3]。本研究应用 SSR 标记对广东 3 个养殖群体的加州鲈基因

组 DNA 进行遗传多样性分析, 以为加州鲈的种质保护和改良提供技术手段和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本 加州鲈样品分别采自广州珠江水产研究所良种基地 (用 G 表示)、顺德大良广东省加州鲈良种养殖场 (用 D 表示) 和顺德勒流镇南水村农兴养殖场 (用 N 表示)。其中, 广州 30 尾, 大良 28 尾, 顺德南水 30 尾。取血液加入 ACD 抗凝剂, 血液与抗凝剂的比例为 1:6, 保存于 -20℃ 备用。

1.1.2 试剂 微卫星引物由上海生工生物工程有限公司合成; dNTPs、Taq DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物科技有限公司, 基因组 DNA 提取试剂盒购自 TANGEN 生物技术公司, SSR DNA Marker 购自北京鼎国生物技术有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用天为时代试剂盒及其提供的方法提取加州鲈血液基因组 DNA。

收稿日期: 2006-11-17; 修订日期: 2007-12-19

基金项目: 国家科技基础条件平台工作项目 (2005DKA21103); 广东省省级财政专项资金资助

作者简介: 梁素娴 (1980—), 女, 广东惠州人; 在读硕士; 研究方向为水产动物繁育学。Tel: 020-81616127; E-mail: showhandliang@126.com

通讯作者: 白俊杰 (1957—), 男, 福建福州人; 研究员; 主要从事鱼类生物技术和遗传育种研究。Tel: 020-81616129; E-mail: baijj2005@

1.2.2 磁珠富集法筛选加州鲈的微卫星标记 参照文献[4]的磁珠富集方法筛选加州鲈的微卫星标记,由北京诺赛基因组研究中心有限公司对阳性克隆进行测序。根据测序结果,使用软件 Primer3.0 设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成引物。

1.2.3 引物筛选及遗传多样性分析 以3个群体混合DNA样品为模板,对微卫星引物进行PCR筛选,从中选择扩增稳定且条带清晰的微卫星引物,用于群体样品的微卫星多态分析。PCR反应总体积为20μL,包括:10×buffer(100mmol/L KCl,80mmol/L

(NH₄)₂SO₄、100mmol/L Tris-HCl(pH9.0)、0.5% NP-40) 2.0μL, MgCl₂(25mmol/L) 0.8μL, 4×dNTP(10μmol/L) 0.3 μL,上下游引物(10μmol/L)各0.5μL,基因组40ng,聚合酶1U,加适量的ddH₂O。反应在PTC-200扩增仪上经过94℃预变性5min后,进行25个循环,每个循环包括94℃30s,退火30s,最后72℃延伸7min。引物及退火温度(表1)。PCR扩增产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完毕后用硝酸银染色,并用扫描仪记录电泳图谱。

表 1 加州鲈微卫星分子标记及其引物
Tab. 1 Microsatellite markers and their primers in Largemouth bass

位点 Locus	引物序列 (5'—3') Primer sequences	片段长度 Size (bp)	重复序列 Repeaat sequence	等位基因数 Number of alleles	退火温度 Annealing temperature (℃)	登录号 GenBank source
JZL12	F: ACTCAGAGCCTCACATTC R: CAGGTGGACTCAAGACAG	202	(CA) ₄₀	2	50	EF055991
JZL23	F: GTCCGTGCTTAGTTTAT R: TCCTTTATCCTTCCCTCT	397	(TG) ₂₉ (AG) ₇	3	50	EF055992
JZL31	F: TGGACTGAGGCTACAGCAGA R: CCAAGAGAGTCCCAAA TGGA	202	(CA) ₂₅	2	60	EF055993
JZL36	F: GCTGAGAGCCTGAAGACCAG R: ATGGAGGACAGCAGGAACAT	214	(CA) ₁₅	2	56	EF055994
JZL37	F: TCCAGCCTTCTTGATTCCCTC R: CCCGTTTAGCCAGAGAA GTG	200	(CA) ₂₄	2	56	EF055995
JZL40	F: GCTGAGAGCCTGAAGACCAG R: ATGGAGGACAGCAGGAACAT	214	(CA) ₁₅	2	58	EF055996
JZL43	F: GCTGCGAGTGCGGTGTAAC TA R: GGGAAGCGAGAGTCAGAGTG	215	(CA) ₂₁	2	58	EF055997
JZL48	F: TCGACGATCAATGGACTGAA R: TCTGGACAACACAGGTGAGG	207	(GT) ₁₃	2	56	EF055998
JZL53	F: AGCCAA TTTCAGCCAA GGT R: TCGACGATCAATGGACTGAA	200	(GT) ₁₃	2	54	EF055999
JZL59	F: CACAAGGCAAACAGAACGTC R: TTGGCTACCCAGTGA TGACA	183	(CA) ₂₁	2	55	EF056000
JZL60	F: AGTTAACCCGCTTTGTGCTG R: GAA GGCGAAGAA GGGAGAGT	205	(CA) ₂₁	2	60	EF056001
JZL67	F: CCGCTAATGAGAGGGAGACA R: ACAGACTAGCGTCAGCAGCA	248	(CA) ₁₆	2	60	EF056002
JZL68	F: AGGCACCGTCTTCTTCTTCA R: CATTTGTGGGTGCA TTCTCC	166	(CA) ₂₀	3	58	EF056003
JZL71	F: GCAGCTTCAAGGTGTGTGTT R: TCGGTGAAC TCCTGTCA GG	202	(GT) ₂₁	2	60	EF056004
JZL72	F: AGGGTTCA TGTTCA TGGTAG R: ACACAGTGGCAAA TGGAGGT	170	(CA) ₂₁	2	59	EF056005
JZL83	F: TGTGGCAAA GACTGA GTGGA R: ATTCTCAACGTGCCAGGTC	157	(CA) ₂₃	3	56	EF056006

续表						
位点 Locus	引物序列 (5'—3') Primer sequences	片段长度 Size (bp)	重复序列 Repeat sequence	等位基因数 Number of alleles	退火温度 Annealing temperature ()	登录号 GenBank source
JZL84	F: GAAAACAGCCTCGGGTGTA R: CACTTGTGCTGCGTCTGTT	197	(CA) ₂₀	3	56	EF056007
JZL85	F: GGGGCTCACTCACTGTGTTT R: GTGCGCAGACAGCTAGACAG	213	(CA) ₁₇	3	58	EF056008
Lma21	F: CAGCTCAATA GTTCTGTCAAG R: ACTACTGCTGAAGA TATTGTG	158—183		3	47.5	Colbourne <i>et al</i> [5]
Mdo7	F: TCAAACGCACCTTCACTGAC R: GTCACTCCCA TCA TGCTCCT	156—172		2	53	Malloy <i>et al</i> [6]
Lar7	F: GTGCTAA TAAAGGCTACTGTC R: TGTTCCTTAA TTGTTTGA	127—155		2	47	DeWoody <i>et al</i> [7]

1.2.4 数据分析 利用所获得的微卫星引物对加州鲈 3个养殖群体进行遗传分析。对每一个微卫星位点的等位基因的数量进行统计,计算每个等位基因的频率,并计算以下参数:

参照文献 [5]的方法计算多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

式中 p_i 、 p_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

多态位点杂和度 (观测值) H_o : H_o 为杂合子观察数与观察个体总数之比。

多态位点杂和度 (期望值) H_e :

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

p_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率。

Hardy-Weinberg遗传偏离指数 (d)

$$d = (H_o - H_e) / H_e$$

2 结果

2.1 克隆与测序结果

挑选 288 个阳性克隆进行测序,成功测序 276 个,其中含微卫星的序列 267 个,占 96.7%。重复次数集中在 20—50 之间,最高达到 174 次重复。根据 Weber 提出的标准,按照微卫星核心序列排列方式的差异,可以将加州鲈微卫星序列分为完美型、非完美型和混合型 3 种类型,其中完美型 175 个,占 65.5%;非完美型 79 个,占 29.6%;混合型 13 个,占 4.9%。

2.2 微卫星的 PCR 扩增结果

采用 18 对微卫星引物对广东 3 个地区养殖加州鲈进行遗传变异分析,它们在所研究的群体中能稳定重复地扩增出相应的序列 (图 1)。不同的引物获得的等位基因为 2—3 个等位基因。其中位点 JZL23、JZL68、JZL83、JZL84、JZL85 和 Lma21 获得 3 个等位基因;其余均获得 2 个等位基因。仅位点

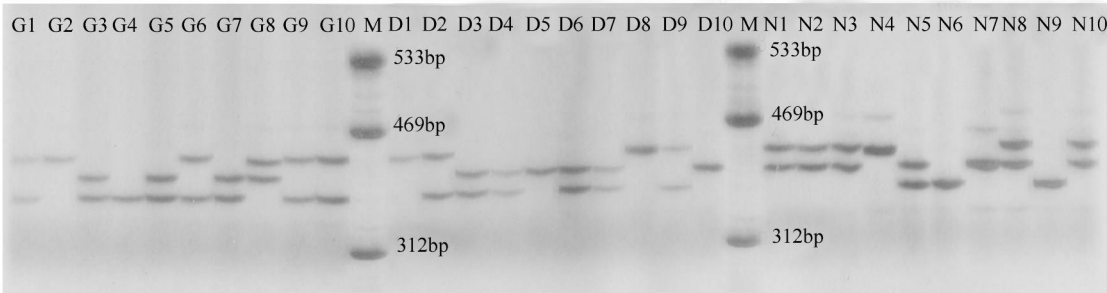


图 1 加州鲈 3 个群体 JZL23 位点的微卫星检测图谱

Fig. 1 Demonstration of microsatellite locus amplified by JZL23 primer pairs in three populations of Largemouth bass

M 为 SD011Marker; G1-G10 为广州群体; D1-D10 为顺德大良群体; N1-N10 为顺德南水群体

G1-G10, Largemouth bass from Guangzhou; D1-D10, Largemouth bass from Daliang; N1-N10, Largemouth bass from Nanshui; M, molecular marker (SD011)

JZL23、JZL85和 Lma21三个位点的多态信息含量大于 0.5,为高度多态;其余为中度或低度多态。每个座位在 3个群体中的等位基因频率和多态信息含量(表 2)。

表 2 加州鲈 3个群体 21个微卫星位点的等位基因频率和多态信息含量
Tab. 2 Allele frequencies of 21 microsatellite loci and PIC for three populations of Largemouth bass

位点 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequencies			多态信息含量 (PIC)			平均 Average
		G群体	D群体	N群体	G群体	D群体	N群体	
JZL12	a	0.0500	0.0714	0.1333	0.0905	0.1238	0.2044	0.1396
	b	0.9500	0.9286	0.8667				
JZL23	a	0.2167	0.3571	0.3500	0.6462	0.5969	0.7436	0.6622
	b	0.2167	0.3929	0.2667				
	c	0.4833	0.2500	0.3833				
JZL31	a	0.3500	0.6071	0.5000	0.3515	0.3633	0.375	0.3632
	b	0.6500	0.3929	0.5000				
JZL36	a	0.1667	0.2500	0.1667	0.2392	0.3047	0.2392	0.2610
	b	0.8333	0.7500	0.8333				
JZL37	a	0.3833	0.1429	0.3500	0.3610	0.2150	0.3515	0.3092
	b	0.6167	0.8571	0.6500				
JZL40	a	0.1333	0.2500	0.1500	0.2044	0.3047	0.2225	0.2439
	b	0.8667	0.7500	0.8500				
JZL43	a	0.7167	0.6964	0.7667	0.3236	0.3334	0.2938	0.3169
	b	0.2833	0.3036	0.2333				
JZL48	a	0.3000	0.1786	0.1500	0.3318	0.2504	0.2225	0.2682
	b	0.7000	0.8214	0.8500				
JZL53	a	0.7667	0.8036	0.7833	0.2938	0.2658	0.2829	0.2808
	b	0.2333	0.1964	0.2167				
JZL59	a	0.8667	0.7857	0.7667	0.2044	0.2802	0.2938	0.2595
	b	0.1333	0.2143	0.2333				
JZL60	a	0.2833	0.3214	0.2667	0.3234	0.3411	0.3146	0.3264
	b	0.7167	0.6786	0.7333				
JZL67	a	0.9000	0.8214	0.9667	0.1638	0.2504	0.0623	0.1588
	b	0.1000	0.1786	0.0333				
JZL68	a	0.6667	0.6429	0.5167	0.3657	0.4710	0.3747	0.4038
	b	0.3167	0.2321	0.4833				
	c	0.0167	0.125					
JZL71	a	0.9333	0.9286	0.9833	0.1158	0.1238	0.0323	0.0906
	b	0.0667	0.0714	0.0167				
JZL72	a	0.2667	0.3571	0.3000	0.3147	0.3537	0.3318	0.3334
	b	0.7333	0.6429	0.7000				
JZL83	a	0.6333	0.5000	0.6167	0.3974	0.4470	0.3610	0.4018
	b	0.3333	0.4464	0.3833				
	c	0.0333	0.0536					
JZL84	a	0.6333	0.6429	0.5167	0.3778	0.4696	0.3747	0.4074
	b	0.3500	0.2500	0.4833				
	c	0.0167	0.1071					
JZL85	a	0.6000	0.5893	0.7167	0.5360	0.5390	0.9436	0.6729
	b	0.1500	0.107	0.0667				
	c	0.2500	0.3036	0.2167				
Lma21	a	0.3500	0.5000	0.6000	0.6404	0.7363	0.8672	0.7480
	b	0.5167	0.4107	0.2500				
	c	0.1333	0.0893	0.1500				

续表

位点 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequencies			多态信息含量 (<i>PIC</i>)			平均 Average
Mdo7	a	0.1333	0.1786	0.0333	0.2444	0.2504	0.0623	0.1723
	b	0.8667	0.8214	0.9667				
Lar7	a	0.1667	0.2500	0.3833	0.2392	0.3047	0.3610	0.3016
	b	0.8333	0.7500	0.6167				

2.3 群体多样性分析

利用所获得的微卫星引物对加州鲈 3 个养殖群体进行遗传多样性分析,计算反映加州鲈养殖群体遗传多样性的 A 、 H_o 、 H_e 和 PIC (表 2和表 3)。分析表明:加州鲈 3 个群体平均等位基因数为 2.14—2.28,观测杂合度 H_o 为 0.356—0.396,期望杂合度的范围为 0.368—0.403, PIC 为 0.0906—0.7480。

表 3 加州鲈 3 个群体 21 个微卫星位点的等位基因数、有效等位基因数、杂合度观测值、期望值及遗传偏离指数 d

Tab.3 Number of alleles (A), number of effective alleles (a_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and d at the 21 microsatellite loci assessed for the three populations in Largemouth bass

位点 Locus	G群体				D群体				N群体			
	$A(a)$	H_o	H_e	d	$A(a)$	H_o	H_e	d	$A(a)$	H_o	H_e	d
JZL12	2(1.1)	0.100	0.097	0.031	2(1.2)	0.143	0.135	0.059	2(1.3)	0.133	0.235	-0.434
JZL23	3(2.7)	0.700	0.640	0.093	3(2.9)	0.536	0.668	-0.198	3(2.9)	0.667	0.671	-0.006
JZL31	2(1.8)	0.433	0.463	-0.065	2(1.9)	0.429	0.486	-0.117	2(2)	0.533	0.509	0.472
JZL36	2(1.4)	0.333	0.283	0.177	2(1.6)	0.357	0.382	-0.065	2(1.4)	0.333	0.283	0.177
JZL37	2(1.9)	0.633	0.481	0.316	2(1.3)	0.286	0.249	0.149	2(1.8)	0.367	0.463	-0.207
JZL40	2(1.3)	0.267	0.235	0.136	2(1.6)	0.357	0.382	-0.065	2(1.3)	0.300	0.259	0.158
JZL43	2(1.7)	0.433	0.413	0.048	2(1.7)	0.536	0.431	0.244	2(1.5)	0.400	0.364	0.099
JZL48	2(1.7)	0.400	0.427	-0.063	2(1.4)	0.357	0.299	0.134	2(1.3)	0.233	0.259	-0.100
JZL53	2(1.6)	0.267	0.364	-0.266	2(1.4)	0.321	0.321	0.000	2(1.5)	0.433	0.345	0.255
JZL59	2(1.3)	0.267	0.235	0.136	2(1.5)	0.357	0.343	0.041	2(1.5)	0.333	0.364	-0.085
JZL60	2(1.7)	0.433	0.413	0.048	2(1.7)	0.500	0.444	0.126	2(1.6)	0.333	0.398	-0.163
JZL67	2(1.2)	0.133	0.183	-0.273	2(1.4)	0.071	0.299	-0.763	2(1.1)	0.067	0.066	0.015
JZL68	3(1.8)	0.467	0.463	0.008	3(2.1)	0.571	0.527	0.083	2(1.9)	0.500	0.508	-0.016
JZL71	2(1.1)	0.067	0.127	-0.472	2(1.2)	0.143	0.135	0.059	2(1)	0.033	0.033	0.000
JZL72	2(1.6)	0.467	0.398	0.173	2(1.8)	0.357	0.468	-0.199	2(1.7)	0.467	0.427	0.094
JZL83	3(1.9)	0.500	0.495	0.010	3(2.2)	0.571	0.558	0.023	2(1.8)	0.367	0.481	-0.237
JZL84	3(1.9)	0.467	0.484	-0.035	3(2.1)	0.571	0.522	0.094	2(1.9)	0.500	0.508	-0.016
JZL85	3(2.2)	0.567	0.564	0.005	3(2.2)	0.607	0.559	0.086	3(1.7)	0.267	0.442	-0.396
Lma21	3(2.5)	0.667	0.603	0.106	3(2.3)	0.607	0.584	0.039	3(2.2)	0.567	0.564	0.004
Mdo7	2(1.3)	0.200	0.235	-0.149	2(1.4)	0.357	0.299	0.194	2(1.1)	0.067	0.065	0.031
Lar7	2(1.4)	0.267	0.283	-0.056	2(1.6)	0.286	0.382	0.251	2(1.9)	0.567	0.481	0.179
平均	2.28(1.67)	0.384	0.375	-0.004	2.28(1.75)	0.396	0.403	0.008	2.14(1.67)	0.356	0.368	-0.008

3 讨 论

微卫星标记由于其高度的多态性,与其他的标记系统相比在检测群体遗传结构方面有明显优势,能更多地揭示群体的遗传变异水平,因而日益受到重视。微卫星位点的多态性水平可用多态信息含量值衡量。一般情况下,多态信息含量值能反映出某个遗传标记所含的或能提供的遗传信息容量。当 $PIC > 0.5$ 时,表明该遗传标记可提供丰富的遗传信息;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,表明该遗传标记能够较为合理地提供遗传信息;而当 $PIC < 0.25$ 时,表明该遗传标记可提供的遗传信息较差^[9]。由表 2 可知,加州鲈种群在位点 JZL23、Lma21 和 JZL85 为高度多态,在位点 JZL31、JZL36、JZL37、JZL43、JZL48、JZL53、JZL59、JZL60、JZL68、JZL72、JZL83、JZL84 和 Lar7 为中度多态,

而在位点 JZL12、JZL40、JZL67、JZL71、Mdo7 为低度多态。

杂合度指微卫星座位为杂合子的比例,它能较好地反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度。普遍认为杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数,其大小可以反映群体遗传变异的高低^[10]。杂合度高的生物群体具有更大的适应环境变化和自然选择的能力,具有更多优良的经济性状,如生长迅速、高抗病能力等^[11,12]。 H_o 和 H_e 量化了基因的遗传多样性, d 值则反映了两者的平衡关系。 d 值越接近0,基因型分布越接近平衡状态; d 值的正负值直观的反映了种群内杂合子的过剩和缺失。由表3可知,广州群体和南水群体表现为杂合子缺失,而大良群体表现为杂合子过度。

本研究结果表明,广州、顺德大良和顺德南水三地区养殖加州鲈的观测杂合度为0.384、0.396和0.356;期望杂合度分别为0.375、0.403和0.356;而21个微卫星位点中仅3个为高度多态位点,13个为中度多态,5个为低度多态。等位基因数、杂合度和多态信息含量等遗传参数说明目前广东地区养殖加州鲈遗传多样性不高。分析原因如下:其一,这与有效亲本数量不够,定向选择增强,导致种质资源衰退可能有一定的关系。这主要由于人工养殖条件下的封闭群体更容易发生瓶颈效应和近交衰退现象而加速种质的同质化,从而降低群体的遗传多样性。最近Chris, et al.^[13]用11个微卫星位点分析美国北部地区和佛罗里达州加州鲈的遗传多样性,结果表明,其平均杂合度分别为0.52和0.41,平均位点数为4.57和4.51,其遗传多样性均远高于本文的研究结果,说明我国广东地区加州鲈遗传多样性比原产地区低,种质资源出现退化。其二,与加州鲈的引进来源有关。目前我国现有加州鲈引进的具体来源还不清楚,有可能引进时加州鲈的种质来源较单一,群体数量不多,导致我国养殖加州鲈种质的遗传多样性保持在较低水平甚至出现退化。鉴于此,在加州鲈的人工繁殖过程中,要重视近交衰退问题,选择遗传变异高的个体进行人工繁殖,扩大遗传变异度,降低近交系数;另外,在引种时,要考虑引进加州鲈亲本的数量及其遗传多样性的大小,及时更新种质和开展加州鲈的良种选育,以免加州鲈种质资源退化,保证加州鲈养殖业的健康持续发展。

参考文献:

- [1] Zhao Y Y, Zhu X C, Sun X W, et al. Polymorphic microsatellite loci of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52 (1): 229—233 [赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 虾夷扇贝的多态性微卫星座位. 动物学报, 2006, 52 (1): 229—233]
- [2] Reeb C A, Arcangeli L, Block B A. Development of 11 microsatellite loci for population studies in the Swordfish, *Xiphias gladius* (Teleostei: Scombridae) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3: 147—149
- [3] Sundin K, Brown K H, Drew R E, et al. Genetic analysis of a development rate QTL in backcrosses of clonal rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 2005, 247: 75—83
- [4] Lu C Y, Sun X W, Liang L Q. Isolation of microsatellite marker in bighead carp *Aristichthys nobilis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12 (2): 192—196 [鲁翠云, 孙效文, 梁利群. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选. 中国水产科学, 2005, 12 (2): 192—196]
- [5] Colbourne J K, Neff B D, Wright J M, et al. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT) microsatellites and its potential for assessment of mating success [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53: 342—349
- [6] Malloy T P, Van Den Bussche R A, Coughlin W D, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in smallmouth bass *Micropterus dolomieu* (Teleostei: Centrarchidae) and cross-species amplification in spotted bass *M. punctulatus* [J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1919—1952
- [7] DeWoody J, Avise J C. Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals [J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 56: 461—473
- [8] Botstein P. Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphism [J]. *Am J Hum Genetic*, 1980, 32: 314
- [9] Liang L Q, Chang Y M, Dong C Z, et al. Genetic analysis for Hucho taimen in Wusuli River with microsatellites [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28 (2): 241—244 [梁利群, 常玉梅, 董崇智, 等. 微卫星标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析. 水产学报, 2004, 28 (2): 241—244]
- [10] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. *Evolution*, 1975, 29: 1—10
- [11] Xu Z, Primavera J P, Pena L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites [J]. *Aquaculture*, 2001, 199: 13—40
- [12] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture [J]. *Aquaculture Res*, 1997, 28: 829—839
- [13] Nice C C, Bonner T H, Forstner M R J. Admixture analysis of Florida Largemouth Bass and Northern Largemouth Bass using microsatellite loci [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2006, 135: 779—791

GENETIC ANALYSIS FOR CULTURED LARGEMOUTH BASS (*MICROPTERUS SALMOIDES*) IN CHINA WITH MICROSATELLITES

LIANG Su-Xian^{1,2}, SUN Xiao-Wen³, BAI Jun-Jie¹ and GAO Jun-Sheng³

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical

Fish Breeding & Cultivation, CAFS, Guangzhou 510380; 2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023;

3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070)

Abstract: The Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), native in the North America, was introduced into China in 1980s and is becoming an important freshwater cultured fish with more than 100,000 tons of production annually in China. For more than 20 years of aquaculture, the germplasm quality and genetic diversity may have declined due to neglecting to inspect the genetic diversity in Largemouth bass and the lack of the long-run and effective administer. In order to aid in investigation of the population genetic structure and marker assisted breeding, microsatellite enrichment by magnetic beads was used to isolating molecular genetic markers. The genomic DNA was cut by the enzyme of *Sau3A*I, and targeted segments were collected with the size of 400—900 base pairs by centrifugation of sucrose density gradient. Then the segments were purified in a low melting agarose gel and ligated with a short linkers (20 bp), from which, the “genetic PCR library” was created. These genomic DNA fragments were hybridized with a biotin-labeled SRS (simple repeat sequence) probe (CA)₁₅. The hybrid mixture was incubated with magnetic beads coated with streptavidin. After washing to remove the non-SRS fragments, the eluted single-stranded DNA contained the selected microsatellite DNA. The selected DNAs were amplified using primers designed complementary to the linkers, cloned into the pMD18-T vector and transformed into competent *E. coli* DH5 α . As a result, 267 microsatellites were obtained and 85 microsatellite primers were designed by software Primer 3.0, and 18 loci showed polymorphism. In addition, 3 pairs of microsatellite primers were obtained from nucleotide web sites. The 21 polymorphic loci were used to estimate genetic diversity and genetic differentiation in 3 culture populations of Largemouth bass, three of which were collected from Guangzhou (G, $n = 30$), Daliang (D, $n = 28$) and Nanshui (N, $n = 30$). Genome DNA was extracted from 88 samples for the three culture populations. Each fish as extracted from blood and the PCR was performed in a 25 L reaction and isolated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gel and visualized by silver staining. The data were calculated and analyzed by statistic method.

The results indicated that: the number of genotypes per locus ranged from 2 to 3, with allele size ranging from 127 bp to 397 bp; the highest numbers of alleles were from locus JZL23, JZL68, JZL83, JZL84, JZL85 and Lma21 (3) followed by the others were only acquired 2 alleles. The mean effective number of three culture populations from Guangzhou, Daliang and Nanshui were 1.67, 1.75 and 1.67, respectively.

Polymorphism information content value (*PIC*) was more than 0.5 in locus JZL23, JZL85 and Lma21; the *PIC* value was more than 0.25 and less than 0.5 in locus JZL32, JZL36, JZL37, JZL43, JZL48, JZL53, JZL59, JZL60, JZL68, JZL72, JZL83, JZL84 and Lar7; the *PIC* value was less than 0.25 in locus JZL12, JZL40, JZL67, JZL71 and Mdo7.

The observed heterozygosity (*Ho*) and the expected heterozygosity (*He*) were calculated based on frequencies of genotypes and alleles of each microsatellite locus, the average *Ho* value was the highest with Daliang ($Ho = 0.396$, $He = 0.403$) and followed by Guangzhou ($Ho = 0.384$, $He = 0.375$) and Nanshui ($Ho = 0.356$, $He = 0.368$). The genetic departure index (*d* value) was ranged from -0.763 to 0.472 *d* value of JZL67 which in Daliang population was -0.763, obviously, on the low side, JZL31 in Nanshui population was 0.472 on the high side, it showed the loci JZL67 deviated from the equilibrium in Daliang population for heterozygosity deficiency and JZL31 in Nanshui population for heterozygosity excess.

All of these indices indicated that the cultured populations of Largemouth bass in Guangdong Province have relatively low genetic diversity, and inbreeding has occurred. The reasons may result from inbreeding while artificial propagation, and neglecting the genetic diversities and population quantity while introduced into China. The methods for prevention of Largemouth bass germplasm degeneration are also suggested.

Key words: Largemouth bass; Microsatellite; Genetic diversity; DNA