

doi: 10.7541/2023.2022.0296

大口黑鲈微卫星多重PCR体系及3个群体的遗传分析

傅建军¹ 龚雅婷² 朱文彬¹ 强俊¹ 张林兵³ 王兰梅¹ 罗明坤¹ 董在杰^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214128; 3. 安徽张林渔业有限公司, 铜陵 244100)

摘要: 为开展大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)种质评估和遗传分析提供便捷的研究手段, 试验筛选了扩增效果好、具有多态性的18个微卫星位点, 构建了6组3重PCR体系。随后将多重PCR体系应用于大口黑鲈3个群体(美国群体USA、“优鲈1号”YLO和杂交子代HYB)的遗传分析。结果显示, 各位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态性信息含量(PIC)分别介于3—14、1.622—5.841、0.333—0.806、0.385—0.833和0.361—0.810, 其均值分别为7.722、3.056、0.577、0.626和0.579。剔除2个偏离Hardy-Weinberg平衡位点的分析显示, YLO的遗传多样性水平最低, HYB的平均观测杂合度最高($H_o=0.743$), 其余多态性指标均在USA中呈现最高值。USA与YLO间的Nei's遗传距离最远(0.362), HYB与USA和YLO间的Nei's遗传距离分别为0.112和0.179。两两群体间均存在极显著的遗传分化($P<0.01$), 其中USA与YLO间遗传分化水平最高($F_{ST}=0.209$)。基于等位基因频率的遗传结构分析结果显示, USA和YLO具有相对独立的遗传结构, 而HYB呈现出不同的遗传来源。主成分判别分析的散点图显示, 不同群体来源的个体能获得有效区分, HYB分布介于USA和YLO的区域之间。研究表明, 试验构建的微卫星多重PCR体系, 涉及位点具有较高多态性, 并能有效应用于大口黑鲈的群体遗传分析, 可为其遗传育种研究提供技术支持。

关键词: 微卫星; 多重PCR; 遗传分析; 大口黑鲈

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)09-1514-09



大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗称加州鲈, 自然分布于北美洲淡水流域^[1]。20世纪70年代末中国台湾地区首先从国外引进大口黑鲈, 1983年引入广东省, 并逐步推广到全国。大口黑鲈市场价格相对较高且较稳定, 具有较好养殖经济效益, 其养殖业发展较快。经过多年的驯化, 以及投喂技术的突破和专用饲料的研发推广, 大口黑鲈的养殖区域和规模迅速扩大, 现已成为我国重要淡水养殖品种之一。2021年淡水鲈产量为70.21万吨, 相比2020年的养殖产量(61.95万吨)增加了13.33%^[2]。但是, 作为外来引进物种, 大口黑鲈缺乏天然种质的有效补充, 加之成熟年限短、世代更新快等特点, 繁殖场在长期扩繁和生产应用中, 容易导致养殖群体种质退化和遗传多样性降低等现象^[3-6], 这严重制约了大口

黑鲈养殖业的可持续发展。因此, 为了满足国内优良种苗的市场需求, 持续开展大口黑鲈遗传改良和良种选育具有重要的现实意义。

就国内的大口黑鲈群体资源而言, 经历引种和长期的驯化养殖, 在摄食和环境适应等方面表现出优势; 但是就其遗传背景来看, 面临种质来源较单一、遗传多样性降低和近交衰退等风险^[3-6]。补充国外原种群体, 可为大口黑鲈的苗种生产和育种开发提供优良种质, 但需要考虑其生长性能和驯食效果等因素^[7, 8]。鉴于此, 合理利用国内群体、并适当引进原种资源, 进而开展杂种优势利用以及群体选育等不失为保障大口黑鲈养殖业健康发展的有效途径。近年来, 基于国内养殖群体和新引进原种群体, 水产工作者在种质改良和新品种培育方面开

收稿日期: 2022-07-18; 修订日期: 2022-09-14

基金项目: 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目(JBGS[2021]130); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 苏州市科技计划项目(SNG2021009)资助 [Supported by the Seed Industry Revitalization Project of Jiangsu Province (JBGS[2021]130); the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46); the Suzhou Science and Technology Plan Project (SNG2021009)]

作者简介: 傅建军(1986—), 男, 博士; 主要研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: fujianjun@ffrc.cn

通信作者: 董在杰(1967—), E-mail: dongzaijie@ffrc.cn

展了大量工作。其中,由珠江水产研究所联合相关企业先后通过群体选育技术完成了大口黑鲈新品种“优鲈1号”和“优鲈3号”的培育,这2个新品种的相继育成,很大程度上满足了大口黑鲈养殖业对优良种质的不断需求。此外,研究人员基于大口黑鲈亚种及群体(养殖群体、选育群体和原种群体)间开展了较多配组试验和生长性能比较等研究^[9-12],这可为其杂种优势利用和遗传改良提供参考依据。

微卫星(Microsatellite)标记,又称简单序列重复(Simple sequence repeats, SSR),具有共显性、分布广泛、多态性高等特征。目前,基于现代检测技术和多重PCR体系的微卫星应用研究,在鱼类种间遗传差异^[13, 14]、群体遗传多样性^[15, 16]和亲子鉴定^[17, 18]等研究中均有报道。高通量检测和多重PCR技术可有效降低实验成本,缩短检测周期,使微卫星逐渐成为鱼类遗传研究的常规工具。在大口黑鲈的相关研究中, Lutz-Carrillo等^[19]和Takagi等^[20]利用近缘物种的微卫星分别对大口黑鲈的美国野生群体和日本的引入群体开展了遗传评估; Bai等^[21]也基于上述标记开展了对中国4个大口黑鲈养殖群体进行了遗传多样性分析,结果显示国内养殖群体的遗传多样性普遍低于Lutz-Carrillo等^[19]报道的美国野生群体。在随后的研究中,梁素娴等^[3]、Lutz-Carrillo等^[22]和Seyoum等^[23]分别开发了大口黑鲈的微卫星标记,进一步丰富了大口黑鲈的分子标记资源。近年来,微卫星已被广泛应用于大口黑鲈群体遗传评估^[3-6, 24, 25]、生长性状关联分析^[26, 27]和亲子鉴定^[28]等研究。但是,目前尚未见有关大口黑鲈微卫星标记多重PCR体系构建和应用的报道。鉴于此,本研究基于公共数据库中大口黑鲈微卫星序列设计引物并构建多重PCR体系,通过群体遗传分析检验其应用效果和潜力,以期为其种质评估和遗传改良等提供高效的研究手段。

1 材料与方法

1.1 试验鱼和DNA提取

2020年,从安徽张林渔业有限公司(国家级安徽铜陵大口黑鲈良种场)收集3个大口黑鲈群体用于本实验微卫星多重PCR体系构建和群体遗传变异研究。其中包括美国引进群体(USA)、“优鲈1号”群体(YLO)和杂交子代群体(HYB, USA ♀×YLO ♂),每个群体采集样本量均为36尾。

每尾鱼剪取鳍条样本,固定于无水乙醇,于4℃保存备用。采用苯酚/氯仿法提取基因组DNA,通

过1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,利用Nano-Drop 2000C分光光度仪检测其浓度,并将DNA样本稀释为20 ng/μL的终浓度,于-20℃保存备用。

1.2 多重PCR构建和位点分型

基于NCBI (National Center for Biotechnology Information)公共数据库上大口黑鲈的微卫星序列设计引物,利用3尾实验鱼的DNA进行PCR扩增条件的摸索,通过3%的琼脂糖凝胶电泳进行验证。筛选扩增条带清晰明亮、无杂带的引物对用于多重PCR体系构建。根据引物的最适退火温度相近、扩增片段长度不同,逐一进行引物对的添加组合,并进行多重PCR扩增和3%的琼脂糖凝胶电泳验证。为了便于后续检测,对初步确定的多重PCR体系中各标记上游引物进行重新合成并加荧光修饰(FAM或HEX),引物合成及荧光修饰由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

多重PCR扩增体系为20 μL,包含10 μL Gold Multiplex Mix 2×(康为世纪,中国),上下游引物各0.30—0.50 μL (10 μmol/L),基因组DNA (20 ng/μL) 2 μL,无菌水补齐体积。PCR扩增程序为: 94℃预变性3min; 94℃变性40s, 55℃退火40s, 72℃延伸40s, 35个循环; 72℃延伸5min。扩增产物经3%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,送上海迈浦生物科技有限公司通过ABI 3730XL测序仪进行毛细管电泳检测,并利用GeneMapper v4.0 软件(ABI, 美国)读取各标记的扩增片段长度。

1.3 数据统计和遗传分析

根据PCR扩增片段长度确定每尾个体各位点的基因型,并通过Excel软件进行数据整理。利用Popgen v3.2软件^[29]计算各位点等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e),并检验位点的HW(Hardy-Weinberg)平衡。利用Cervus v3.0软件^[30]分别计算和估算各位点的多态性信息含量(Polymorphism information content, PIC)和无效等位基因频率(Null allele frequency estimate, F_{null})。

利用Arlquin v3.5软件^[31]计算群体分化的F-统计量(F_{ST})和分子方差分析(AMOVA),利用Popgene v1.32软件^[29]计算群体间Nei's遗传距离。基于各位点在群体中的等位基因频率,利用Structure v2.3软件^[32]进行群体遗传结构分析,探讨最佳K值,即理论遗传聚类。为了进一步验证所选位点在群体遗传判别中的效果,利用adegenet包^[33]开展主成分判别分析(Discriminant analysis of principal component, DAPC),相关分析在R程序中完成(<http://www.R-project.org/>)。

2 结果

2.1 微卫星多重PCR体系

本研究筛选出18个扩增效果好的大口黑鲈微

卫星位点,并构建了6组3重PCR体系。所述多重PCR体系及引物信息如表1所示。大口黑鲈微卫星6组多重PCR体系中各位点扩增效果理想,相邻位点的扩增片段均能有效区分(图1)。

表1 大口黑鲈微卫星标记多重PCR体系及引物信息

Tab. 1 Multiplex PCR panels of microsatellites in *Micropterus salmoides*

组合 Panel	位点 Locus	收录号 Accession No.	引物序列 Primer sequences (5'—3')	引物含量 Volume (μL)
Panel 1	P1L1	EF055999	FAM-GTAACGGCTGGTAGTGTG GAGATGTCAGAGGTGAAGAA	0.35
	P1L2	EF055995	HEX-GGTAGCAGCGTTAGGAT AACACGGACTCACGACAT	0.35
	P1L3	DQ211538	FAM-AAGCGTGTGGTTAGGATG GCAGATAAGTGGCAGTGT	0.45
Panel 2	P2L1	EU152098	FAM-GCTGCGACCATTAAAGACT CCGACTCTTCTCATCAACA	0.40
	P2L2	EF590108	HEX-TGGCTGCGTAATTGTATGT TGGAGGAGCGTTATTGAAG	0.35
	P2L3	EF590089	FAM-TAGTGTATTGCTCTGAAGGT AACATACTGCTGATGGAGAA	0.50
Panel 3	P3L1	EF590097	FAM-GACTCCAGAGATGAATAATGA GCAGACCAGCAACACTAA	0.45
	P3L2	EF055997	HEX-CGTGTAACATGGTGATGTG GAAGCGAGAGTCAGAGTG	0.40
	P3L3	EF055993	FAM-GAAGGACACCATAACAACACT CCTCTCCATCCTCCTCATC	0.50
Panel 4	P4L1	EF590088	FAM-TGAGCGAAGGACGGATTA ATTAGGTGGCAAGATAGACA	0.35
	P4L2	EU180174	HEX-TGGTGAACACAGCAGAAC GGACAGCCTCAATACATCTT	0.45
	P4L3	EF055994	FAM-GCAGAGCAGAAGAATGACT TGAACACAACGACACCAC	0.45
Panel 5	P5L1	EF590092	FAM-AGTATGTGTGGTCCTGTCT CCTCAGTCACCAGTTCATC	0.35
	P5L2	EF590096	HEX-AATGTCTTGAGAGGTTCCA TAGAGTGTAGATTAGTCAGTCC	0.30
	P5L3	GU085829	FAM-GTGATAGAGGACGGTAGGT CAACGAGATGATGACGGAA	0.45
Panel 6	P6L1	DQ211536	FAM-ACTCCTATTGTGTCTGTTACC CAGTGCCGCAGTTACATT	0.40
	P6L2	EF590064	HEX-TTATGCTTGTTCCTCTGTCT TTCTCTGCCTGGTCATTAG	0.40
	P6L3	EF055996	FAM-GAGCAGAAGAATGACTTGTTG ATGGAGGACAGCAGGAAC	0.50

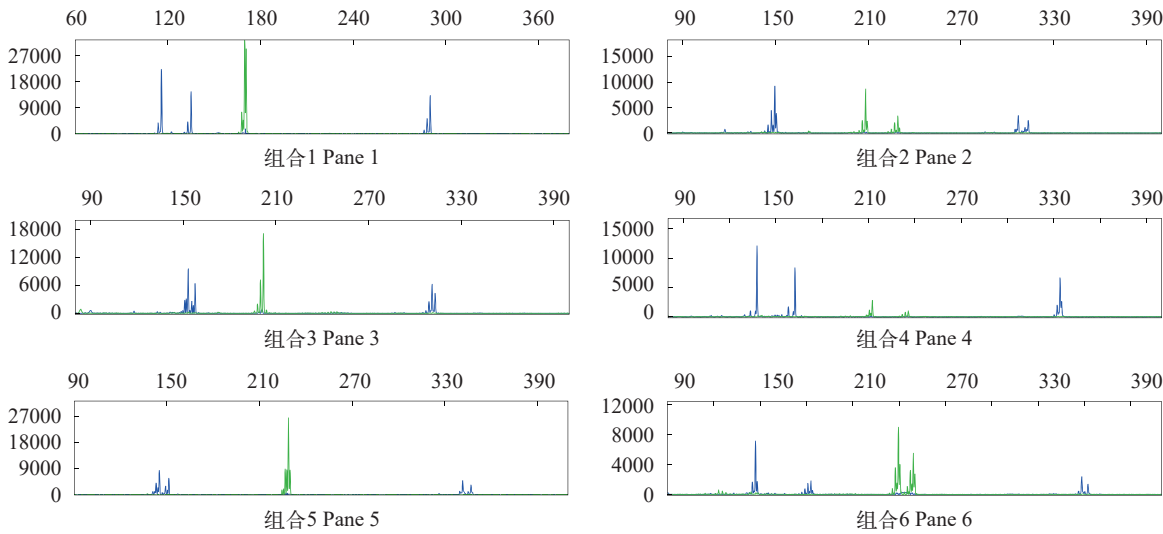


图1 大口黑鲈6组微卫星多重PCR的分型图

Fig. 1 Genotype results of six multiplex PCR panels of microsatellites in *Micropterus salmoides*

2.2 位点多态性和群体多样性

如表 2 所示, 18 个微卫星位点共检测到 139 个等位基因, 各位点的等位基因数为 3—14 (均值为 7.722); 有效等位基因数为 1.622—5.841 (均值为 3.056); 观测杂合度为 0.333—0.806 (均值为 0.577); 期望杂合度为 0.385—0.833 (均值为 0.626); 多态性信息含量为 0.361—0.810 (均值为 0.579)。

在整体上, 16 个微卫星位点符合 HW 平衡 ($P>0.05$), 2 个位点 (P3L3 和 P5L2) 极显著偏离 HW 平衡 ($P<0.01$); 而且, P3L3 和 P5L2 位点均存在杂合度缺失现象, 其无效等位基因频率分别为 0.2128 和 0.1464, 并高于其他位点。进一步检测 2 位点在各群体内的 HW 平衡情况, 发现 P3L3 位点在 3 个群体内均符合 HW 平衡 ($P>0.05$); 而 P5L2 位点在 USA 和 HYB 群体内符合 HW 平衡 ($P>0.05$), 在 YLO 群体内表现为单态 (纯合)。为了避免可能存在无效等位基因对遗传多样性参数估算带来的影响, 在后续的群

体遗传分析中将剔除 P3L3 和 P5L2 位点的相关数据。

如表 3 所示, USA 群体具有最高的等位基因数 (6.625)、有效等位基因数 (3.544)、期望杂合度 (0.663) 和多态性信息含量 (0.611); HYB 群体具有最高的观测杂合度 (0.743); 而 YLO 群体的各项遗传多样性参数均低于 USA 群体和 HYB 群体。

2.3 群体遗传分化和遗传结构分析

如表 4 所示, USA 群体与 YLO 群体的遗传距离最远 (0.362), 而 HYB 群体与亲本群体间的遗传距离相近, 与 USA 群体和 YLO 群体间的遗传距离分别为 0.112 和 0.179。同时, 3 个群体间均存在极显著遗传分化 ($P<0.01$); 基于 Balloux 等^[34]对遗传分化水平的界定, USA 群体与 HYB 群体间存在较低遗传分化 ($F_{ST}<0.05$), YLO 群体与 HYB 群体存在中等遗传分化 ($F_{ST}=0.05—0.15$), USA 群体与 YLO 群体间存在较大遗传分化 ($F_{ST}=0.15—0.25$)。分子方差分析结果如表 5 所示, 群体间和群体内的遗传变异分别占总

表 2 大口黑鲈 18 个微卫星位点多态性参数统计结果

Tab. 2 The polymorphism parameters of eighteen microsatellites in *Micropterus salmoides*

位点 Locus	大小 Size (bp)	等位基 因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	多态性信 息含量 PIC	HW 平衡 P_{HWE}	无效等位 基因频率 F_{null}
P1L1	112—140	7	2.446	0.546	0.594	0.514	0.218	0.0453
P1L2	160—200	8	2.246	0.546	0.557	0.494	0.800	0.0092
P1L3	276—294	5	1.707	0.333	0.416	0.380	0.061	0.1091
P2L1	125—155	5	1.622	0.352	0.385	0.361	0.536	0.0395
P2L2	204—240	7	2.746	0.611	0.639	0.573	0.629	0.0217
P2L3	307—329	7	2.523	0.565	0.606	0.555	0.905	0.0220
P3L1	137—151	6	3.302	0.630	0.700	0.646	0.056	0.0592
P3L2	194—218	6	2.853	0.648	0.652	0.588	0.890	0.0029
P3L3	310—340	7	3.591	0.472	0.725	0.675	0.000	0.2128
P4L1	109—163	10	4.368	0.750	0.775	0.744	0.063	0.0130
P4L2	200—242	14	5.089	0.722	0.807	0.787	0.465	0.0528
P4L3	326—382	11	5.110	0.806	0.808	0.781	0.074	0.0095
P5L1	137—161	9	2.272	0.565	0.562	0.533	0.783	0.0034
P5L2	230—282	11	1.936	0.398	0.486	0.468	0.000	0.1464
P5L3	358—362	3	1.880	0.407	0.470	0.367	0.128	0.0734
P6L1	147—183	7	3.089	0.611	0.679	0.628	0.084	0.0592
P6L2	240—250	3	2.379	0.630	0.582	0.516	0.410	0.0431
P6L3	355—411	13	5.841	0.796	0.833	0.810	0.686	0.0173
均值 Mean	—	7.722	3.056	0.577	0.626	0.579	—	—

表 3 大口黑鲈 3 个群体遗传多样性参数统计结果

Tab. 3 Genetic diversity parameters of three populations in *Micropterus salmoides*

群体 Population	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态性信息含量 PIC
美国群体 USA	6.625	3.544	0.642	0.663	0.611
优鲈 1 号 YLO	3.188	1.953	0.399	0.426	0.370
杂交群体 HYB	4.938	3.061	0.743	0.629	0.563

遗传变异的12.865%和87.135%。

基于16个微卫星位点的等位基因频率, 对大口黑鲈所有个体分别执行假设 K 值为2和3的遗传结构分析(图2)。USA群体和YLO群体的个体遗传结构相对单一, 而HYB群体内个体遗传结构显示具有不

表4 大口黑鲈3个群体间Nei's遗传距离(对角线下)和遗传固定指数 F_{ST} (对角线上)

Tab. 4 Nei's genetic distances (below diagonal) and genetic fixation indexes F_{ST} (above diagonal) among three populations in *Micropterus salmoides*

群体Population	美国群体USA	优鲈1号YLO	杂交群体HYB
美国群体USA	—	0.209**	0.044**
优鲈1号YLO	0.362	—	0.132**
杂交群体HYB	0.112	0.179	—

注: **表示极显著($P<0.01$), 下同

Note: **indicate extremely significant ($P<0.01$), the same applies below

表5 大口黑鲈3个群体分子遗传变异方差分析(AMOVA)结果

Tab. 5 Analysis of molecular variance of three populations in *Micropterus salmoides*

变异来源 Source of variation	变异方差 Sum of squares	方差组分 Variance components	百分比 Percentage variation (%)	固定指数 Fixation index
群体间 Among populations	106.551	0.676	12.865	0.129**
群体内 Within populations	975.694	4.581	87.135	
总和Total	1082.245	5.257		

同的遗传来源, 整体有别于亲本群体。此外, 基于微卫星等位基因频率的主成分判别分析的结果(图3), 进一步表明不同群体来源的大口黑鲈个体能获得较有效区分和判别, 且杂交群体介于亲本群体之间。

3 讨论

微卫星标记的多态性信息含量代表其在群体遗传研究中的利用效率, 本研究涉及18个微卫星位点呈现较高的多态性水平($PIC>0.5$), 说明能为大口黑鲈群体遗传研究提供有效的遗传信息。这些标记在整体上呈现了较高的杂合度水平, 所有位点的平均观测杂合度和期望杂合度分别为0.577和0.626。目前, 基于微卫星标记针对大口黑鲈群体开展了较多的遗传多样性研究^[3-6, 24, 25]。本研究筛选和检测的18个位点的多态性信息含量和杂合度等参数普遍高于梁素娴等^[3]、樊佳佳等^[4]、孙成飞等^[5]和Bai等^[24]的报道, 而与苏胜彦^[6]和Wang等^[25]的报道相近。在不同的研究报告中, 由于所用标记、检测方法、群体遗传背景和样本量存在差异, 往往导致在分析结果上存在差异, 这在一定程度上降低了相关研究间的可比性。鉴于此, 开发或筛选多态性高的微卫星标记, 同时采用通用性好的检测方法, 有助于不同试验间的数据共享和比较。此外, 多重PCR体系将为试验提供便利, 并可有效降低检测成本, 现已被较多应用于水产遗传育种研究领域^[13-18]。本研究筛选了18个具有较高多态性的大口黑鲈微

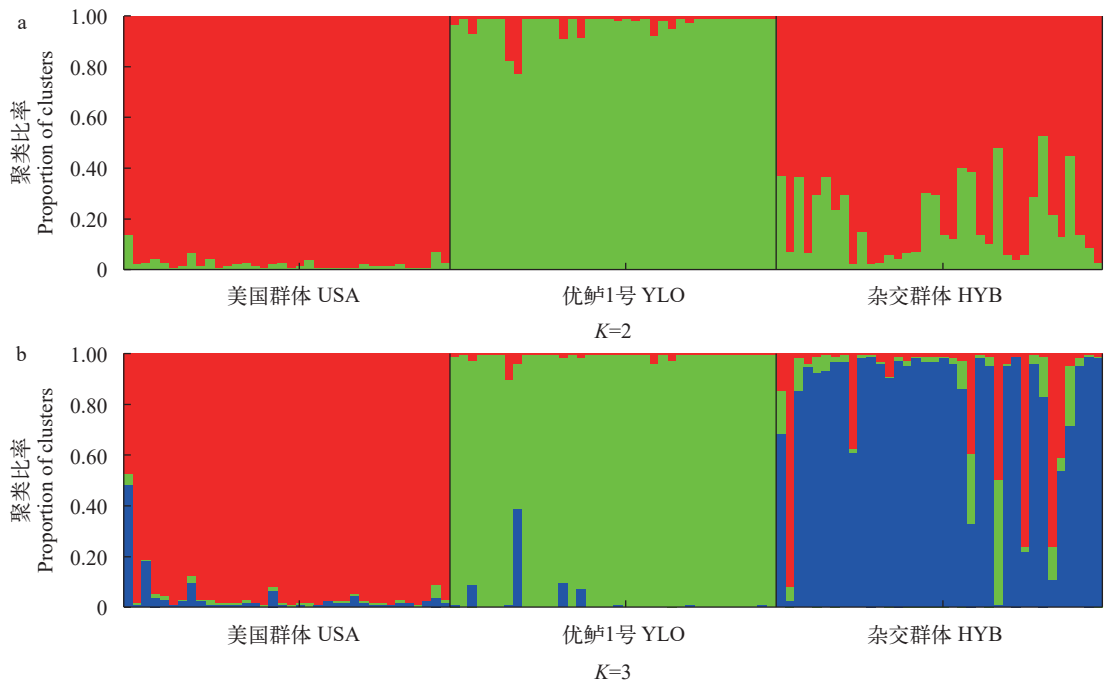


图2 大口黑鲈个体在不同 K 值下的遗传结构图

Fig. 2 Genetic structure assumed under different inferred K values for *Micropterus salmoides* individuals

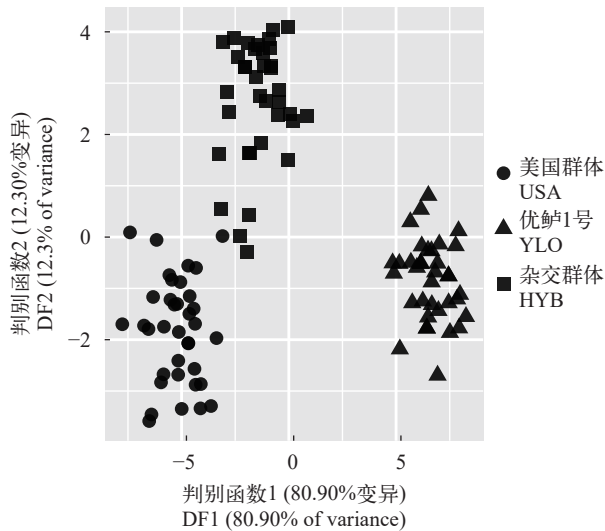


图3 大口黑鲈个体基于微卫星等位基因频率主成分判别分析的散点图

Fig. 3 Scatter plots of discriminant analysis of principal component (DAPC) for *Micropterus salmoides* individuals based on allele frequency of microsatellite markers

卫星标记, 并成功构建了6组多重PCR体系, 这可为大口黑鲈群体遗传分析提供高效便捷的研究工具。

本研究中2个微卫星位点(P3L3和P5L2)在整体水平偏离HW平衡且存在较高无效等位基因频率, 这可能会对遗传多样性参数的估算带来影响^[35], 因此在后续的分析中剔除了这2个位点的数据。就群体属性而言, 本研究中群体材料包含原产地引进的USA群体、经历长期人工选择的YLO群体和人工配组的HYB群体, 3个群体所经历人工选择强度和历程存在不同, 会导致其在等位基因频率上的差异。在整体水平的遗传多样性参数估算中, 由于种群结构的存在, 会引起Wahlund效应(混合群体期望杂合度偏高), 进而对位点HW平衡和无效等位基因分析产生影响。在对P3L3和P5L2位点在3个群体内等位基因频率的分析中, 发现P5L2位点在YLO群体中表现为纯合, 而P3L3和P5L2在其余单个群体中均未发现偏离HW平衡现象。其中, YLO群体的选育基础群体均来自于国内养殖群体且经历了高强度的人工选择, 这可能导致该群体在某些位点上已经(或高度)纯合; 在统计分析中, 易被判定是存在无效等位基因导致的杂合度缺失。因此, 本研究中发现部分位点在整体水平偏离HW平衡并存在较高无效等位基因频率的现象, 推测是3个研究群体间的遗传结构差异所导致。

在本研究中, YLO群体的遗传多样性水平最低, 与孙成飞等^[5]和苏胜彦等^[6]基于相同检测技术对国内养殖群体的检测结果相似。在长期人工定

向选择和繁育进程中, 可能导致“优鲈1号”遗传多样性水平的降低; 罗相忠等^[16]和董在杰等^[36]分别在对鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鲤(*Cyprinus carpio*)的群体遗传分析中均有类似发现。本研究中美国引进的USA群体, 相较于国内养殖和选育群体^[5, 6, 10], 其多项遗传多样性参数均呈现较高水平, 这与其引进后经历繁育和选育世代较短有关, 说明该群体保留了丰富的遗传变异信息, 存在开展选育利用的潜力。此外, HYB群体呈现较高的遗传多样性和杂合度水平, 尤其是观测杂合度大于其亲本USA群体和YLO群体, 类似结果在周家辉等^[10]和王宏玉等^[37]分别开展的鱼类群体间和种间杂交试验中均有发现。用于杂交配组的亲本群体在等位基因频率上往往存在差异, 杂交过程会伴随不同等位基因的重组, 进而提高杂交子代的观测杂合度, 这也为杂交子代的表型变异提供遗传基础。正如李江涛等^[11]研究发现大口黑鲈群体间杂交子代的生长性状和体型指标在变异系数上均有所提高。因此, 在开展鱼类群体选育的过程中, 通常会利用不同群体开展杂交配组来构建基础群体, 为人工选择提供充足的遗传变异。

在本研究中, USA群体和YLO群体间存在较大遗传分化($F_{ST}=0.209$, $P<0.01$), 反映了2群体在等位基因频率上的差异, 这可能与YLO群体经历长期定向选育对其等位基因频率的影响有关。同时, 这也预示着利用上述群体开展杂种优势利用的潜力, 正如周家辉等^[10]、李江涛等^[11]和龚雅婷等^[12]利用大口黑鲈群体开展配组试验, 均发现杂交子代具有生长优势。在对本研究3个大口黑鲈群体的遗传结构和主成分判别分析中, 同样发现USA群体和YLO群体间存在明显的遗传结构差异, 进一步验证了通过微卫星标记开展种质鉴定(或判别)的应用效果; 其分析结果的可视化水平与傅建军等^[13]和Fang等^[14]在种间鉴定中的实验结果相当。可见, 本研究所筛选并构建的微卫星多重PCR体系, 可为大口黑鲈群体遗传评估和鉴定提供有效手段。此外, 考虑到大口黑鲈是引进物种, 其在国内的种群资源有限, 加之繁殖周期较短, 这容易导致养殖和育种群体遗传多样性降低和近交衰退, 进而加剧群体间的遗传分化进程。因此, 非常有必要鼓励国内养殖和育种单位从原产地更多引进优质群体资源, 用于开展遗传改良和(或)杂种优势利用, 为国内大口黑鲈养殖业健康可持续发展提供种质支撑。

参考文献:

[1] National Characteristic Freshwater Fish Industry Techno-

- logy System. Report on the Development of Freshwater Perch Industry in China [J]. *China Fisheries*, 2021(3): 40-48. [国家特色淡水鱼产业技术体系. 中国淡水鲈产业发展报告 [J]. 中国水产, 2021(3): 40-48.]
- [2] Fishery Administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2022 China Fishery Statistics Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 25. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 25.]
- [3] Liang S X, Sun X W, Bai J J, *et al.* Genetic analysis for cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China with microsatellites [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 694-700. [梁素娴, 孙效文, 白俊杰, 等. 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 [J]. 水生生物学报, 2008, **32**(5): 694-700.]
- [4] Fan J J, Bai J J, Li S J, *et al.* Establishment of DNA fingerprinting and analysis on genetic structure of largemouth bass with microsatellite [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(4): 600-609. [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星DNA指纹图谱的构建和遗传结构分析 [J]. 水生生物学报, 2012, **36**(4): 600-609.]
- [5] Sun C F, Xie W F, Hu J, *et al.* Genetic diversity analysis of three cultured populations of *Micropterus salmoides* [J]. *South China Fisheries Science*, 2019, **15**(2): 64-71. [孙成飞, 谢汶峰, 胡婕, 等. 大口黑鲈3个养殖群体的遗传多样性分析 [J]. 南方水产科学, 2019, **15**(2): 64-71.]
- [6] Su S Y, Zhang L B, Li H Y, *et al.* Genetic diversity and structure analyses of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) original and cultured populations based on microsatellite markers [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)*, 2020, **46**(6): 687-698. [苏胜彦, 张林兵, 李海洋, 等. 基于微卫星标记的大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 原种和养殖群体遗传多样性的结构分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2020, **46**(6): 687-698.]
- [7] Liu H Y, Li S J, Bai J J. Comparative analysis of growth performance between cultured and introduced populations of largemouth bass [J]. *Journal of Aquaculture*, 2015, **36**(9): 1-5. [刘海涌, 李胜杰, 白俊杰. 大口黑鲈养殖群体和引进群体生长性能的比较分析 [J]. 水产养殖, 2015, **36**(9): 1-5.]
- [8] Zhao L, Li S J, Bai J J, *et al.* Transfer food from zooplankton to formulated feed in juvenile selectively bred largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Fisheries Science*, 2019, **38**(6): 846-850. [赵萃, 李胜杰, 白俊杰, 等. 大口黑鲈选育群体幼鱼转食配合饲料的驯食研究 [J]. 水产科学, 2019, **38**(6): 846-850.]
- [9] Wang P P, Zhou G Q, Chen S Q, *et al.* Analysis of growth trait comparison and genetic diversity of F1 progeny on cross species of southern largemouth bass, northern largemouth bass and "Youlu No. 3" [J]. *Marine Fisheries*, 2020, **42**(4): 403-409. [王佩佩, 周国勤, 陈树桥, 等. 大口黑鲈北方亚种、佛罗里达亚种及“优鲈3号”杂交 F1 子代生长性能及遗传多样性分析 [J]. 海洋渔业, 2020, **42**(4): 403-409.]
- [10] Zhou J H, Li S J, Jiang P, *et al.* Comparison analysis of genetic diversity and growth traits among "Youlu No. 1" and their reciprocal hybrids of northern *Micropterus salmoides* [J]. *Marine Fisheries*, 2020, **42**(3): 324-331. [周家辉, 李胜杰, 姜鹏, 等. 大口黑鲈北方亚种群体和“优鲈1号”群体及其正反杂交子代的遗传和生长性能比较 [J]. 海洋渔业, 2020, **42**(3): 324-331.]
- [11] Li J T, Yang K Y, Qiu X T, *et al.* Comparison of growth and morphological characteristics of inbred and hybrid families of *Micropterus salmoides* from Foshan and Taiwan populations [J]. *South China Fisheries Science*, 2021, **17**(5): 1-9. [李江涛, 杨凯宇, 邱晓桐, 等. 大口黑鲈佛山和台湾群体自交与杂交子代的生长和形态差异分析 [J]. 南方水产科学, 2021, **17**(5): 1-9.]
- [12] Gong Y T, Fu J J, Zhu W B, *et al.* Growth traits comparison and path analysis of two populations of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and their reciprocal hybrids [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, **31**(1): 131-139. [龚雅婷, 傅建军, 朱文彬, 等. 大口黑鲈2群体双列杂交子代的生长比较及通径分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, **31**(1): 131-139.]
- [13] Fu J J, Xu R W, Xue T, *et al.* Genetic analysis of three stocks of loach with microsatellite markers and D-Loop partial sequences [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(4): 465-474. [傅建军, 徐如卫, 薛婷, 等. 3种泥鳅微卫星标记和D-Loop部分序列遗传变异分析 [J]. 水产学报, 2015, **39**(4): 465-474.]
- [14] Fang M, Fu J, Zhu W, *et al.* Multiplex microsatellite PCR panels and their application in genetic analyses of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and silver carp (*H. molitrix*) [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2020, **36**(3): 342-348.
- [15] Li W Q, Chen G, Ma Q, *et al.* Genetic diversity in five cultured population of cobia (*Rachycentron canadum*) using microsatellite markers [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, **41**(2): 113-120. [李伟强, 陈刚, 马骞, 等. 利用微卫星标记分析军曹鱼养殖群体的遗传多样性 [J]. 渔业科学进展, 2020, **41**(2): 113-120.]
- [16] Luo X Z, Qin W M, Liang H W, *et al.* Genetic monitoring of Changfeng silver carp base on microsatellite [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, **46**(5): 725-734. [罗相忠, 覃维敏, 梁宏伟, 等. 基于微卫星分析的长丰鲢种质资源遗传监测 [J]. 水生生物学报, 2022, **46**(5): 725-734.]
- [17] Zhang S Y, Liu H Y, Wang J, *et al.* Establishment and application of pedigree identification technique for channel catfish based on microsatellite markers [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(2): 327-333. [张世勇, 刘洪岩, 王江, 等. 基于微卫星标记的斑点叉尾鲷家系鉴定技术及

- 应用[J]. *水生生物学报*, 2021, **45**(2): 327-333.]
- [18] Li L L, Xing L M, Yu Z X, *et al.* Parentage assignment of *Silurus lanzhouensis* using multiplex PCR of microsatellites [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(3): 530-540. [李兰兰, 邢露梅, 俞兆曦, 等. 基于微卫星多重PCR技术的兰州鲈亲缘鉴定[J]. *水生生物学报*, 2021, **45**(3): 530-540.]
- [19] Lutz-Carrillo D J, Nice C C, Bonner T H, *et al.* Admixture analysis of Florida largemouth bass and northern largemouth bass using microsatellite loci [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2006, **135**(3): 779-791.
- [20] Takagi M, Ishii Y, Shimizu T. Genetic variability of the largemouth bass, *Micropterus salmoides* in ehime prefecture, Japan [J]. *Aquaculture Science*, 2007, **55**(2): 237-243.
- [21] Bai J, Lutz-Carrillo D J, Quan Y, *et al.* Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass *Micropterus salmoides* in China [J]. *Aquaculture*, 2008, **278**(1/2/3/4): 27-30.
- [22] Lutz-Carrillo D J, Hagen C, Dueck L A, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci for Florida largemouth bass, *Micropterus salmoides floridanus*, and other micropterygids [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, **8**(1): 178-184.
- [23] Seyoum S, Barthel B L, Tringali M D, *et al.* Isolation and characterization of eighteen microsatellite loci for the largemouth bass, *Micropterus salmoides*, and cross amplification in congeneric species [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2013, **5**(3): 697-701.
- [24] Austin J D, Johnson A, Matthews M, *et al.* An assessment of hatchery effects on Florida bass (*Micropterus salmoides floridanus*) microsatellite genetic diversity and sib-ship reconstruction [J]. *Aquaculture Research*, 2012, **43**(4): 628-638.
- [25] Wang D, Yao H, Li Y H, *et al.* Global diversity and genetic landscape of natural populations and hatchery stocks of largemouth bass *Micropterus salmoides* across American and Asian regions [J]. *Scientific Reports*, 2019(9): 16697.
- [26] Fan J J, Bai J J, Li X H, *et al.* Identification of microsatellite markers associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides* L.) [J]. *Hereditas*, 2009, **31**(5): 515-522. [樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 等. 大口黑鲈生长性状的微卫星DNA标记筛选[J]. *遗传*, 2009, **31**(5): 515-522.]
- [27] Xu L, Bai J J, Li S J. The effect of pyramiding growth-related genotypes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, **21**(1): 53-58. [徐磊, 白俊杰, 李胜杰. 大口黑鲈生长性状相关标记的聚合效果分析[J]. *中国水产科学*, 2014, **21**(1): 53-58.]
- [28] He X Y, Bai J J, Liu X L, *et al.* Application of microsatellite makers for parentage determination in *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2009, **37**(8): 55-62. [何小燕, 白俊杰, 刘小林, 等. 微卫星DNA标记在大口黑鲈亲权鉴定中的应用[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2009, **37**(8): 55-62.]
- [29] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, **89**(3): 583-590.
- [30] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program *CERVUS* accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(5): 1099-1106.
- [31] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**(3): 564-567.
- [32] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, **155**(2): 945-959.
- [33] Jombart T. ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers [J]. *Bioinformatics*, 2008, **24**(11): 1403-1405.
- [34] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. *Molecular Ecology*, 2002, **11**(2): 155-165.
- [35] Wen Y F, Uchiyama K, Han W J, *et al.* Null alleles in microsatellite markers [J]. *Biodiversity Science*, 2013, **21**(1): 117-126. [文亚峰, Kentaro Uchiyama, 韩文军, 等. 微卫星标记中的无效等位基因[J]. *生物多样性*, 2013, **21**(1): 117-126.]
- [36] Dong Z J, Liu N, Fu J J, *et al.* Genetic analysis for six wild and selection populations of common carp (*Cyprinus carpio*) using microsatellites [J]. *South China Fisheries Science*, 2018, **14**(4): 46-55. [董在杰, 刘念, 傅建军, 等. 6个野生与选育鲤群体的微卫星遗传分析[J]. *南方水产科学*, 2018, **14**(4): 46-55.]
- [37] Wang H Y, Wu Z W, Fu D Y, *et al.* Genetic diversity of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (♀), longsnout catfish *Leiocassis longirostris* (♂) and their hybrid F₁ generation [J]. *Fisheries Science*, 2021, **40**(2): 226-232. [王宏玉, 武兆文, 付东勇, 等. 黄颡鱼(♀)、长吻鲢(♂)及其杂交F₁代遗传多样性分析[J]. *水产科学*, 2021, **40**(2): 226-232.]

MULTIPLEX PCR SETS OF MICROSATELLITES AND THEIR APPLICATION IN GENETIC ANALYSES FOR THREE POPULATIONS OF LARGEMOUTH BASS (*MICROPTERUS SALMOIDES*)

FU Jian-Jun¹, GONG Ya-Ting², ZHU Wen-Bin¹, QIANG Jun¹, ZHANG Lin-Bing³, WANG Lan-Mei¹,
LUO Ming-Kun¹ and DONG Zai-Jie^{1,2}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China; 3. Zhanglin Fisheries Company, Tongling 244100, China)

Abstract: Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) has been introduced approximately for forty years, and it becomes an economically important cultured fish in China. However, there is a lack of natural population supply in breeding and a risk of genetic degradation in the utilization progress. The imbalance between large industrial demand and shortage of improved varieties of *M. salmoides* are arisen in China. Genetic evolution is the baseline for genetic improvement and selection breeding programs. The microsatellites with multiplex PCR method is popularity applied for genetic analyses in fish species. In this study, we developed six multiplex PCR panels based on 18 polymorphic microsatellites, and subsequently used in genetic analyses for three populations of *M. salmoides*, i.e., original population of American (USA), “Youlu No. 1” variety (YLO), and their hybrid population (HYB). The results showed that, the parameters of number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) for 18 loci were ranged from 3 to 14, 1.622 to 5.841, 0.333 to 0.806, 0.361 to 0.810, mean with 7.722, 3.056, 0.577 and 0.579, respectively. Excluding two loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium, the lowest values of all diversity parameters were observed in YLO, while the highest H_o was detected in HYB (0.743), and the highest values of other diversity parameters were detected in USA. The farthest Nei’s genetic distance was evaluated between USA and YLO (0.362); meanwhile, similar Nei’s genetic distances were evaluated between HYB with other two populations (i.e., 0.112 and 0.179 for USA and YLO, respectively). Extremely significant genetic differentiations were revealed among all pairwise populations ($P < 0.01$), and the highest fixation index was detected between USA and YLO ($F_{ST} = 0.209$). According to the genetic structure analysis based on the allele frequency, relatively independent genetic structures were presented within USA and YLO, while admixture in genetic structure was generally showed in HYB. Additionally, the distinct distributions of individuals from three populations were visualized by using scatter plots of discriminant analysis of principal component (DAPC), and HYB showed with interval distribution between USA and YLO. In brief, six multiplex PCR panels of 18 microsatellites were developed firstly in *M. salmoides*, relatively high polymorphisms were detected among these loci, and the effective application in genetic analyses was evaluated in this study. That provided valuable tools for genetic and breeding researches in *M. salmoides*.

Key words: Microsatellite; Multiplex PCR; Genetic analysis; *Micropterus salmoides*