

文章编号: 1674-5566(2018)02-0161-07

DOI:10.12024/jsou.2017082122

菊黄东方鲀野生和人工选育群体遗传变异的 SSR 和 ISSR 分析

于爱清, 施永海, 张海明, 谢永德, 徐嘉波

(上海市水产研究所, 上海市水产技术推广站, 上海 200433)

摘要: 利用 SSR 和 ISSR 两种分子标记技术, 对菊黄东方鲀的人工选育群体 (SH) 和野生群体 (YS) 的遗传变异和遗传结构进行了联合分析。SSR 分析的结果显示, 14 个微卫星位点总共获得了 146 个等位基因, 选育和野生群体的平均期望杂合度 (H_e) 分别为 0.730 0 和 0.832 3, 平均多态信息含量 (PIC) 分别为 0.705 1 和 0.813 6; ISSR 结果显示, 选育和野生群体的平均 Nei's 基因多样性指数 (H) 分别为 0.267 2 和 0.282 3, 平均 Shannon 信息指数 (I) 为 0.407 2 和 0.425 6, 表明菊黄东方鲀选育群体的遗传变异程度低于野生群体。此外, 两种分子标记遗传分化的结果显示, 两个群体的遗传分化指数分别为 0.061 9 (SSR) 和 0.061 5 (ISSR), 表明两个群体已经产生了中等程度的遗传分化。综上, 本单位菊黄东方鲀的人工选育群体仍然具有相对较丰富的遗传变异以供进一步的遗传改良。

关键词: 菊黄东方鲀; SSR; ISSR; 人工选育; 野生群体

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

菊黄东方鲀 (*Takifugu flavidus*) 主要分布于我国东海海域和黄渤海海域, 具有重要的经济、养殖和药用价值^[1-2]。近年来, 菊黄东方鲀自然种质资源由于生存环境的恶化而日趋枯竭^[3], 同时养殖生产过程中存在的成活率低、大小规格差异显著等问题严重制约了其养殖产业的可持续发展, 亟需利用分子标记技术加速其良种的选育进程。截至目前, 不同学者利用微卫星 (SSR) 分子标记技术解析了红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 和暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 等不同群体或家系间的遗传差异, 并对分子标记辅助东方鲀的良种选育进行了初步的研究探讨^[4-8], 而菊黄东方鲀良种选育研究相对较少^[9-11]。本研究利用 SSR 和 ISSR 两种分子标记技术对本单位的菊黄东方鲀第 4 代选育群体进行了遗传评估, 以保证其良种选育工作的顺利进行。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的菊黄东方鲀选育群体 (以下简称

SH), 是以捕获于我国东海海域的野生群体为基础群体, 生长速度为选育指标, 历经 12 年 4 代的群体选育, 平均每代按照雌雄配组比 1:1.5 选择繁育亲本 (总选择率为 3%~8%) 50 组, 于 2015 年在上海市水产研究所奉贤科研基地获得第 4 代选育群体。野生群体 (以下简称 YS) 则是于 2015 年捕获于浙江省舟山市嵊泗县黄龙岛和徐公岛的周边水域, 亦是后续放流群体的储备繁育亲本。从菊黄东方鲀选育群体和野生群体中各随机选取 30 尾健康的菊黄东方鲀, 剪取部分尾鳍保存于 95% 的乙醇溶液中, 分别编号后置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照常规的酚-氯仿抽提程序进行, 并利用琼脂糖凝胶电泳和 NanoVuePlus 紫外可见分光光度计检测 DNA 的质量和浓度。样本 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 显示无拖尾降解现象、条带清晰, 且 OD_{260nm}/OD_{280nm} 的值在 1.8~2.0 的 DNA 样品, 稀释到 50 ng/ μ L 后, 保存于 -20 °C 冰箱中备用。

收稿日期: 2017-08-31 修回日期: 2017-12-27

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201203065); 上海长江口主要经济水生动物人工繁育工程技术研究中心项目 (13DZ2251800); 上海市市级农口系统青年人才成长计划 [沪农青字 (2015) 第 3-3 号]

作者简介: 于爱清 (1985—), 男, 博士, 工程师, 研究方向为动物遗传育种。E-mail: aiqingyu0125@163.com

通信作者: 施永海, E-mail: yonghais@163.com

1.3 SSR-PCR 和 ISSR-PCR 反应体系、反应条件及 PCR 产物检测

参考已报道的暗纹东方鲀和红鳍东方鲀的微卫星序列和引物^[8,12]及 ISSR 通用引物,分别选取 30 对 SSR 引物和 100 条 ISSR 引物交由上海生物工程技术有限公司合成。经梯度 PCR 扩增和 PCR 反应条件优化后,选取在菊黄东方鲀中扩增效果较好且多态性较高的 14 对 SSR 引物和 23 条 ISSR 引物(表 1)用于后续实验。

SSR-PCR 扩增反应总体积为 25 μL ,内含约 50 ng 基因组 DNA、12.5 μL 2 \times Taq PCR MasterMix (1.25 U Taq 聚合酶、500 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3)、100 mmol/L KCl 和 3 mmol/L MgCl₂)、正反向引物各 1 $\mu\text{mol/L}$ 、ddH₂O 补充总体积至 25 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ (根据各引物的最适退火温度进行调整) 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 扩增产物利用 QIAxcel 全自动实时毛细管电泳系统进行基因分型检测,电泳结果利用 QIAxcelScreenGel 1.0.0 软件进行片段大小的评估并输入到 Excel 中备用。

ISSR-PCR 扩增反应总体积为 25 μL ,内含约 25 ng 基因组 DNA、12.5 μL 2 \times Taq PCR MasterMix (1.25 U Taq 聚合酶、500 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、20 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3)、100 mmol/L KCl 和 3 mmol/L MgCl₂)、正反向引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、ddH₂O 补充总体积至 25 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,45 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ (根据各引物的最适退火温度进行调整) 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,40 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 产物经由 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用 Syngene 凝胶成像系统进行拍照记录,并利用 Gene Tool 软件进行电泳条带的统计。

1.4 数据分析

SSR 数据主要基于各等位基因条带的大小进行统计,ISSR 数据基于 0/1 矩阵(有条带记为 1,无条带记为 0)进行统计分析。两种分子标记的统计结果,均利用 GenAlEx 6.5 软件^[13]计算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)、Nei's 遗传多样性指数(H)、Shannon 多样性指数(I)等遗传参

数,并基于 NEI^[14]遗传多样性参数计算群体间的遗传距离。利用 ARLEQUIN 2.000 软件^[15],计算群体遗传分化指数 F_{ST} ,估计群体间的遗传分化程度,分析群体内和群体间的分子方差(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)。

参照 BOSTEIN 等的计算公式计算多态信息含量(PIC):

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

式中: C_{PI} 为多态信息含量; P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

2 结果

2.1 SSR 和 ISSR 引物的筛选

本研究从 30 对微卫星引物和 100 条 ISSR 引物中分别筛选出重复性好、多态性高的 14 对 SSR 引物和 23 条 ISSR 引物(表 1)用于菊黄东方鲀不同群体的遗传变异分析,图 1 和图 2 分别为 SSR 引物 Fms32 和 ISSR 引物 UBC834 在菊黄东方鲀部分个体中的 PCR 扩增电泳图谱。

2.2 群体遗传多样性

有效等位基因数、期望杂合度和多态信息含量往往能够反映出群体间的遗传差异。本研究中,14 个微卫星位点总共检测到 146 个等位基因,其中在菊黄东方鲀选育群体中共检测到 118 个等位基因,在野生群体中检测到 137 个等位基因。选育群体和野生群体的平均有效等位基因数(N_e)、平均期望杂合度(H_e)和平均多态信息含量(PIC)分别为 4.361 7 和 6.694 2,0.730 0 和 0.832 3,0.705 1 和 0.813 6(表 2)。其中:14 个微卫星位点中,选育群体有 2 个位点为中度多态($0.25 < PIC < 0.5$),12 个位点为高度多态($PIC > 0.5$);野生群体中全部位点均为高度多态($PIC > 0.5$)。

23 条 ISSR 引物在选育群体和野生群体中分别检测到 169 和 174 条多态性位点,多态位点百分数分别为 84.08% 和 86.57%。选育群体的平均有效等位基因数(N_e)为 1.447 1,比野生群体低 1.981 8%;Nei's 基因多样性指数(H)为 0.267 2,比野生群体低 5.35%;Shannon's 信息指数(I)为 0.407 2,比野生群体低 4.32%(表 3)。

表 1 试验所用 SSR 和 ISSR 引物序列信息
 Tab.1 Nucleotide sequences of selected SSR and ISSR primer in the experiment

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature
F0001	F: ACCCAATCTCACCTCCTG; R: AACCCAAAAGTTTGACCCT	58.5
F0002	F: AAACACCAAAGAAAGCCACT; R: ATTACCGCACTCCCTACC	54.8
F0005	F:TCTCCCTTACACCAAACG; R: TTCCCACTGCTGAAGACC	53.0
F0012	F: GAAGGGCTGGCAGAACAC; R: CCCGCTTAGAATCCTGTT	61.0
F0013	F: CACTCGGCATAGCAGACC; R: TATCAGGCACCGCAAGAA	56.0
Fms32	F: ACACCGCTCAATGCAAACCTC; R: AATGTGGCGGCTACTTTTCAG	58.5
Fms57	F: CCAGCACAGGCCACTTCAGAT; R: ATTCTGAGCATCCGCATTGT	62.0
Fms118	F: ACTGGACCCTGTGTTGCTCT; R: CCTCAGTGGTGCCAGTGTA	62.0
Tob10	F: ACCCACTCCGTCCTTCCT; R: TCAACCGCCCTTCCAAC	61.0
Tob11	F: GCCATATTGACCACTCACC; R: ACCACAGAATGTCCTGCTT	56.5
Tob13	F: AGTAGAACGCTCGGTCAG; R: GTTTGTAATCATCAAAGG	50.5
Tob25	F: ACTCTTTCTCCAGCTCTTC; R: TGCTTCCTTTGATTTGTAT	50.5
Tob61	F: AGAGGCTCCTGGGGAATT; R: CAGCCCTGTCTCACACAT	56.5
Tob108	F: TCCATTACCACAGAATGTCCTG; R: GTGCCATATTGACCACTCACCTA	55.5
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	60.0
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	60.0
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.5
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	50.5
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	56.0
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	53.5
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	52.5
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	56.5
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	47.5
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52.5
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	48.5
UBC843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	48.5
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	55.5
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	51.8
UBC846	CACACACACACACACART	57.5
UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	52.5
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	49.0
UBC855	ACACACACACACACACYT	58.5
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	49.5
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	52.0
UBC876	GATAGATAGACAGACA	52.0
UBC881	GGGTGGGCTGGGCTG	62.8
UBC899	CATGGTGTGGCTCATTGTCCA	54.5

注: Y = C/T; R = A/G

Notes: Y = C/T; R = A/G

2.3 遗传距离和遗传分化

基于等位基因频率计算所获得的遗传距离能够准确反映出群体间的遗传变异程度,遗传距离越大,表明群体间遗传关系越远,遗传变异程度越大。本研究中,两种分子标记检测到的菊黄东方鲀选育群体和野生群体间的遗传距离分别为 0.297 5 (SSR) 和 0.050 9 (ISSR),而遗传分化指数分别为 0.061 9 (SSR) 和 0.061 5 (ISSR) (表

4),表明两种分子标记所获得的菊黄东方鲀选育群体和野生群体间遗传距离差异较大,但是遗传分化程度的结果基本相似。此外,分子方差分析 (AMOVA) 显示,两个群体间的遗传变异有 6.19% 来自于群体间,35.71% 来自于群体间个体间,58.11% 来自于群体内个体间,表明两个群体的遗传变异主要来源于群体不同个体间的遗传差别 (表 5)。

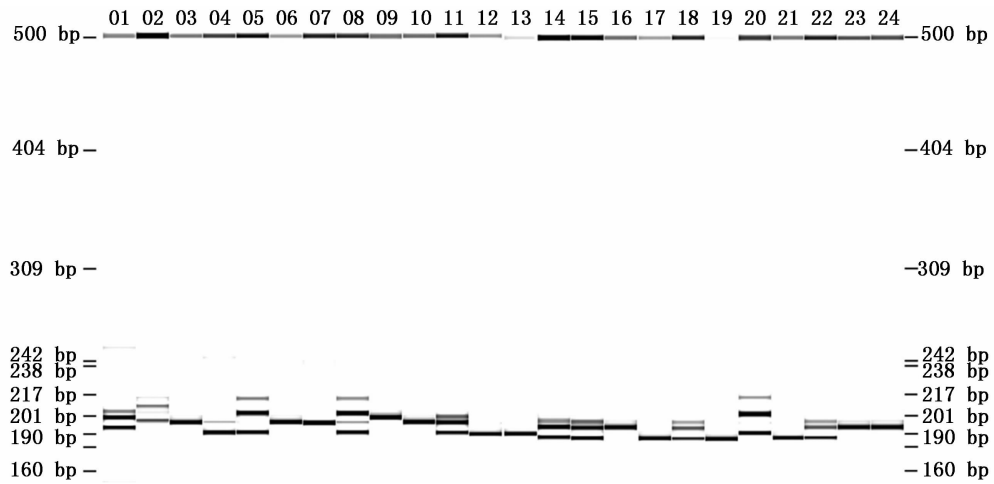


图1 微卫星位点 Fms32 在部分菊黄东方鲀个体中的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.1 The results of SSR-PCR primer Fms32 in partial individuals of *T. flavidus*

野生群体:1~12; 选育群体:13~24

Wild populations:1-12; selected populations:13-24

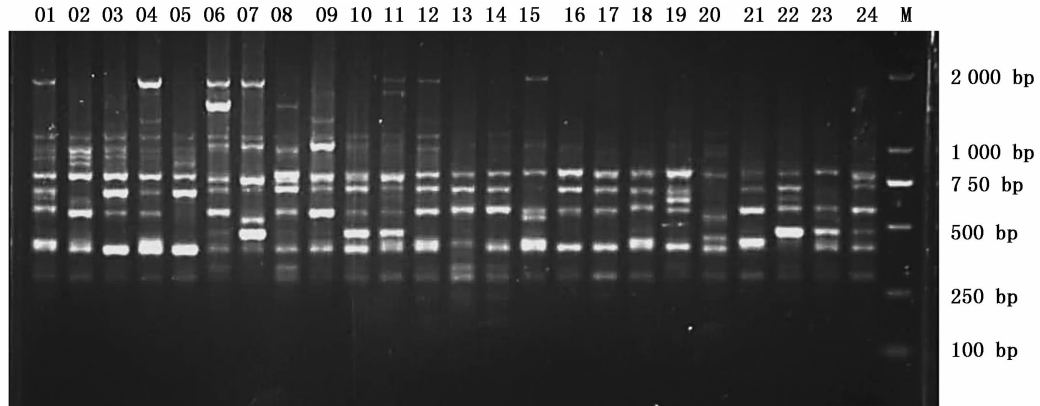


图2 ISSR 引物 UBC834 在菊黄东方鲀部分个体中的 PCR 扩增电泳图谱

Fig.2 The results of ISSR-PCR primer UBC834 in partial individuals of *T. flavidus*

野生群体:1~12; 选育群体:13~24; M 为 DL2000 分子量标记

Wild populations:1-12; selected populations:13-24; M means molecular weight maker of DL2000

表2 菊黄东方鲀野生和选育群体遗传多样性的 SSR 分析

Tab.2 Genetic diversity indices of wild and selected populations in *T. flavidus* by SSR

群体 Populations	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	多态信息含量 PIC
SH	8.428 6	4.361 7	0.440 5	0.730 0	0.705 1
YS	9.785 7	6.694 2	0.550 0	0.832 3	0.813 6
平均值 Mean	9.107 1	5.527 9	0.495 2	0.781 2	0.759 3

表3 菊黄东方鲀野生和选育群体遗传多样性的 ISSR 分析

Tab.3 Genetic diversity indices of wild and selected populations in *T. flavidus* by ISSR

群体 Populations	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	多态位点百分率 /% PPB	Nei's 多样性指数 H	Shannon's 信息指数 I
SH	1.840 8	1.447 1	84.08	0.267 2	0.407 2
YS	1.865 7	1.475 4	86.57	0.282 3	0.425 6
平均值 Mean	1.853 2	1.461 2	85.32	0.274 7	0.416 4

表 4 菊黄东方鲀野生和选育群体间的遗传距离(对角线以上)和遗传分化指数(对角线以下)

Tab. 4 Genetic distance (above diagonal) and genetic diversity coefficient (below diagonal) of wild and selected populations in *T. flavidus*

群体 Populations	SH	YS
SH	-	0.061 9(SSR)/0.061 5(ISSR)
YS	0.297 5(SSR)/0.050 9(ISSR)	-

表 5 菊黄东方鲀野生和选育群体的 AMOVA 分析

Tab. 5 The AMOVA analysis of wild and selected populations in *T. flavidus*

变异来源 Source	自由度 Df	方差 SS	均方差 MS	变异组分 Est. Var	所占比例/%
群体间 Among populations	1	29.866 7	29.866 7	0.369 0	6.19
个体间 Among individuals	58	448.166 7	7.727 0	2.130 2	35.71
个体内 Within individuals	60	208.000 0	3.466 7	3.466 7	58.11
合计 Total	119	686.033 3		5.965 8	100.00

3 讨论

人工选育群体由于受到奠基者效应、人工选择以及遗传漂变等因素的影响,其遗传变异程度相对于野生群体往往会有不同程度的降低,这是水产动物种质资源保护和利用的核心问题。因此,在水产动物遗传改良的过程中,利用种质创新对养殖性状和遗传纯度给予改良和提高的同时,还要降低瓶颈效应和近交衰退的发生概率,这就需要及时地从分子水平上检测繁育亲本的遗传变异程度,以保证繁育亲本具有优良生长性状的同时,保持丰富的遗传变异。鉴于 SSR 和 ISSR 两种标记交替分布于动物基因组 DNA 中,且具有丰富的等位基因变异,本研究利用这两种分子标记技术联合分析菊黄东方鲀选育和野生群体的遗传变异情况,以期能够更加准确地解析这两个群体的分子遗传差异。

等位基因、杂合度和多态信息含量等遗传参数是评估群体遗传变异程度的重要参考指标。本研究中,SSR 分子标记的研究结果显示菊黄东方鲀选育群体的 N_e 、 H_e 和 PIC 分别为 4.361 7、0.730 0 和 0.705 1,显著低于野生群体 ($P < 0.05$);ISSR 分子标记的结果显示,菊黄东方鲀选育群体的 H 和 I 分别为 0.267 2 和 0.282 3,分别比野生群体低 5.35% 和 4.32%。两种分子标记对于菊黄东方鲀选育和野生群体遗传变异的检测结果表明,SSR 标记所检测到遗传变异程度要大于 ISSR 标记,这可能与毛细管电泳(SSR)和琼脂糖凝胶电泳(ISSR)两种检测方法灵敏度以及两种分子标记本身的遗传特性(SSR 为共显性遗

传,ISSR 为显性遗传)有关。此外,两个群体的 $N_a > N_e$ 且 $H_o < H_e$,表明两个群体的等位基因分布不均匀,且存在不同程度的杂合子缺失,这一现象在草鱼^[16]、暗纹东方鲀^[8]、罗非鱼^[17]及鲤鱼^[18]等养殖群体中亦有所发现,这可能与不同群体所面临的选择压力、繁育亲本的近交效应和稀有等位基因的缺失等因素有关,特别是选育群体,往往会伴随着人工选育的进程而日趋纯化。依据 BOTSTEIN 等提出的多态信息含量的判断标准,当 $PIC < 0.25$ 、 $0.25 < PIC < 0.5$ 、 $PIC > 0.5$ 时,分别代表该位点具有低度、中度、高度多态性^[19]。本研究中,菊黄东方鲀选育群体中只有两个位点为中度多态性($0.25 < PIC < 0.5$),其余位点均为高度多态性($PIC > 0.5$),野生群体的所有位点均为高度多态性($PIC > 0.5$),表明菊黄东方鲀选育群体和野生群体均具有丰富的遗传变异。菊黄东方鲀选育群体,历经 4 代的人工选育,仍然具有相对较高的遗传变异,一方面是由于本单位具有较大的繁育亲本数量(每代繁育亲本 500 尾左右)和选择强度(3%~8%),在进行菊黄东方鲀群体选育时,能够选取较多生长性状优良的繁育亲本,有效地降低了近亲交配的发生概率和繁育子代遗传多样性降低的风险;另一方面,菊黄东方鲀繁育周期长,选育世代数较少以及野生群体繁育亲本来源地和来源时间的差异亦是两个群体产生遗传差异和分化的主要影响因素。

选择往往能够诱导等位基因的变异,从而使选育群体能够产生遗传上的分化,而这个遗传上的分化程度常常利用遗传分化指数(F_{ST})度量。基于 WRIGHT 等的分类标准,群体遗传分化指数

(F_{ST}) 在 0~0.05、0.05~0.15、0.15~0.25 时,分别表示群体间遗传分化微弱、遗传分化中等、遗传分化较大^[20]。在本研究中,SSR 和 ISSR 两种分子标记所获得的菊黄东方鲀野生和选育群体的遗传分化系数分别为 0.061 9 和 0.061 5,表明两个群体间已经产生了中等程度的遗传分化,人工选择导致选育群体出现了一定程度的遗传趋异。而基因流(Nm)能够在一定程度上防止遗传漂变所引起的遗传分化,根据公式: $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/4$,可知菊黄东方鲀选育和野生群体的基因流为 3.79,表明两个群体在遗传上存在一定程度的基因流,主要是由于本单位菊黄东方鲀最初的基础群体来源于东海海域的野生群体,而基因流不仅能够代表不同群体间的实际基因交换情况,还代表过去群体间产生的基因交流,因此这部分基因流主要来源于选育群体的基础群体。此外,AMOVA 分析结果亦表明,有 6.19% 的遗传变异来源于野生和选育群体间,而大部分(93.81%)遗传差异主要来源于群体个体间的遗传差异。以上结果表明,菊黄东方鲀选育群体经过 4 代的人为定向选育,与其野生群体在等位基因构成和遗传结构上产生了不同程度的遗传离异,遗传多样性亦有所降低,这就需要在菊黄东方鲀的后续选育过程中,制定科学、有效的育种策略,并适时地对繁育子代进行遗传监测,以保证繁育子代在生长性状改良的同时,仍具有丰富的遗传变异。

参考文献:

- [1] 张忠华,张根玉,张海明,等. 菊黄东方鲀池塘养殖技术[J]. 水产科技情报, 2009, 36(5): 209-211.
ZHANG Z H, ZHANG G Y, ZHANG H M, et al. Pond culture technology of *Takifugu flavidus*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2009, 36(5): 209-211.
- [2] 杨竹舫,张汉秋,匡云华. 渤海湾菊黄东方鲀 *Fugu flavidus* 生物学的初步研究[J]. 海洋通报, 1991, 10(6): 44-47.
YANG Z F, ZHANG H Q, KUANG Y H. Studies on biology of *Fugu flavidus* in Bohai Bay[J]. Marine Science Bulletin, 1991, 10(6): 44-47.
- [3] 施永海,张根玉,朱雅珠,等. 河口区养殖菊黄东方鲀的胚胎发育[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(3): 238-242.
SHI Y H, ZHANG G Y, ZHU Y Z, et al. Embryonic development in cultured tawny puffer *Takifugu flavidus* in an estuary[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(3): 238-242.
- [4] 刘永新,刘奕,周勤,等. 利用微卫星标记指导红鳍东方鲀亲本选配[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(2): 113-119.
LIU Y X, LIU Y, ZHOU Q, et al. Application of microsatellite markers in parental apogamy of redfin puffer *Takifugu rubripes*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(2): 113-119.
- [5] 孙建华,马爱军,崔文晓,等. 利用微卫星标记技术对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)家系系谱认证的研究[J]. 海洋科学进展, 2017, 35(3): 392-403.
SUN J H, MA A J, CUI W X, et al. Parentage determination of the *Takifugu rubripes* families by microsatellite markers[J]. Advances in Marine Science, 2017, 35(3): 392-403.
- [6] 陆丽君. 红鳍东方鲀国内主要养殖区养殖群体遗传多样性研究及与性别相关微卫星标记筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
LU L J. Polymorphisms analyzing of the main farming regions of *Takifugu rubripes* and isolation of gender-specific microsatellite markers [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [7] 程长洪. 暗纹东方鲀种群遗传多样性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
CHENG C H. Analysis of genetic diversity of obscure puffer (*Takifugu obscurus*) populations [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [8] 邹杰. 暗纹东方鲀养殖群体遗传多样性分析及生长性状微卫星标记筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
ZOU J. Studying genetic structure among cultured populations and screening growth-related DNA markers in *Takifugu obscurus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [9] 钟建兴,钟然,杨盛昌. 菊黄东方鲀和双斑东方鲀及其种间杂交子代的 ISSR 分析[J]. 台湾海峡, 2008, 27(2): 152-155.
ZHONG J X, ZHONG R, YANG S C. ISSR analysis on two species of fugu and their hybrid descendants[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2008, 27(2): 152-155.
- [10] 施永海,谢永德,刘永士,等. 菊黄东方鲀幼鱼转食过程中生长和脂肪酸组成变化[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(1): 48-56.
SHI Y H, XIE Y D, LIU Y S, et al. The changes in growth and fatty acid composition of tawny puffer (*Takifugu flavidus*) juvenile during the bait conversion period [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(1): 48-56.
- [11] 张宗锋,施永海,谢永德,等. 菊黄东方鲀脊柱、四肢骨骼及皮刺的早期发育[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(6): 853-865.
ZHANG Z F, SHI Y H, XIE Y D, et al. Early development of the vertebral column, appendicular skeleton and aculeus in the tawny puffer (*Takifugu flavidus*) [J]. Journal of Shanghai

- Ocean University, 2016, 25(6): 853-865.
- [12] 程长洪, 张敏莹, 徐东坡, 等. 4 个暗纹东方鲀群体的遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(5): 634-640.
CHENG C H, ZHANG M Y, XU D P, et al. Analysis of genetic diversity in four *Takifugu obscurus* populations [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(5): 634-640.
- [13] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Resources, 2006, 6(1): 288-295.
- [14] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [15] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOEFFIER L. Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis [M]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.
- [16] 傅建军, 李家乐, 沈玉帮, 等. 草鱼野生群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传, 2013, 35(2): 192-201.
FU J J, LI J L, SHEN Y B, et al. Genetic variation analysis of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers [J]. Hereditas, 2013, 35(2): 192-201.
- [17] 李腾云, 李思发. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼回交子代遗传变异的微卫星分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 396-401.
LI T Y, LI S F. Microsatellite marker analysis of genetic variation in the backcross progenies from *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(4): 396-401.
- [18] 池喜峰, 贾智英, 李池陶, 等. 荷包红鲤与德国镜鲤正反杂交组遗传结构的微卫星分析[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(5): 450-455.
CHI X F, JIA Z Y, LI C T, et al. Analysis of genetic structure in obverse and inverse cross of purse red carp and German mirror carp by microsatellite markers [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(5): 450-455.
- [19] 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): 314-331.
- [20] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations (Volume 4) [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

Genetic variation analysis between wild and selected populations of *Takifugu flavidus* using SSR and ISSR markers

YU Aiqing, SHI Yonghai, ZHANG Haiming, XIE Yongde, XU Jiabo

(Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China)

Abstract: Simple Sequence Repeat (SSR) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were applied to measure the genetic variation and genetic structure of the selected stock (SH) and wild population (YS) of *Takifugu flavidus*. Results of SSR showed that a total of 146 alleles were detected among 60 individuals with 14 polymorphic microsatellite loci, and the mean of expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) of two populations ranged from 0.730 0 to 0.832 3 and from 0.705 1 to 0.813 6, respectively. The analysis of ISSR showed that the average Nei's gene diversity index (H) of selected stock and wild population were 0.267 2 and 0.282 3, respectively, while the average Shannon information index (I) of two populations were 0.407 2 and 0.425 6, respectively. These results showed that the genetic variation of wild population was higher than that of the selected population of *Takifugu flavidus*. Additionally, genetic differentiation coefficient (F_{ST}) value between the two populations of *Takifugu flavidus* were 0.061 9 (SSR) and 0.061 5 (ISSR), which indicated that two populations generated moderate genetic differentiation. These results above indicated that the selective breeding stock of *Takifugu flavidus* still possessed abundant genetic variation at population level, and had great potential for artificial selection and breeding.

Key words: *Takifugu flavidus*; SSR; ISSR; selective breeding; wild population