

# 湖栖鳍虾虎鱼微卫星 DNA 标记的开发与群体遗传多样性分析

黄承勤 黄英毅 黄欣 王中铎 郭昱嵩\*

广东海洋大学水产学院, 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室 湛江 524088

**摘要:** 为研究雷州半岛湖栖鳍虾虎鱼 (*Gobiopterus lacustris*) 遗传多样性, 对湖栖鳍虾虎鱼雌雄性腺进行转录组测序, 采用 MISA 软件进行微卫星分析, 共获得 25 452 个微卫星标记, 其中包含 14 708 个单碱基重复类型, 6 175 个 2 碱基重复类型, 3、4、5 和 6 碱基重复类型数目分别为 4 223、327、15 和 4。随机选取 50 个微卫星位点设计引物, 能够扩增出清晰稳定条带的有 39 对, 其中, 11 个位点表现出不同程度的多态, 28 个位点呈现单态。利用 11 个具有多态性的微卫星位点分析湖栖鳍虾虎鱼在廉江市高桥镇红树林保护区、湛江东海岛、雷州市附城镇和雷州市九龙山红树林国家湿地公园 4 个野生群体中的遗传多样性及遗传结构, 11 个微卫星位点呈现出不同程度的多态性, 等位基因数 ( $N_a$ ) 2 ~ 15, 平均等位基因为  $(6 \pm 3.9)$  个, 有效等位基因数 ( $N_e$ )、平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 和期望杂合度 ( $H_e$ ) 分别在 1.919 ~ 2.485、0.343 ~ 0.465 和 0.381 ~ 0.483 之间, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.348 ~ 0.465。Hardy-Weinber 平衡分析显示, 4 个群体的大部分位点未偏离平衡。在每个群体中进行连锁不平衡分析, 有 18 对位点间显著 ( $P < 0.05$ ) 或者极显著 ( $P < 0.01$ ) 偏离连锁平衡。遗传分化系数在 0.107 ~ 0.216 之间, 表明 4 个群体的遗传分化达到了中等水平以上。分子方差分析 (AMOVA) 显示, 湖栖鳍虾虎鱼大部分的差异来自于群体内而非群体间。

**关键词:** 湖栖鳍虾虎鱼; 地理群体; 微卫星 DNA; 遗传多样性

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2020) 01-067-10

## Development of Microsatellite DNA Markers and Analysis of Population Genetic Diversity in *Gobiopterus lacustris*

HUANG Cheng-Qin HUANG Ying-Yi HUANG Xin WANG Zhong-Duo GUO Yu-Song\*

Fisheries College of Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for

Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524088, China

**Abstract:** To understand the genetic diversity of *Gobiopterus lacustris* in the Leizhou Peninsula, transcriptomic sequencing of male and female gonads was performed. Using MISA software, 25 452

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31201996), 广东海洋大学创新强校项目 (No. 230419055);

\* 通讯作者, E-mail: gysrabbit@163.com;

**第一作者介绍** 黄承勤, 男, 硕士研究生; 研究方向: 海洋生物学; E-mail: trankin@foxmail.com.

收稿日期: 2019-08-18, 修回日期: 2019-12-15 DOI: 10.13859/j.cjz.202001009

microsatellite markers were identified from the transcriptome data. A total of 14 708 single-base repeat types and 6 175 two-base repeat types were identified, while the numbers of three-, four-, five-, and six-base repeats were 4 223, 327, 15 and 4, respectively. By randomly selecting 50 microsatellite loci to design primers, 39 pairs of clear and stable bands could be amplified. The genetic diversity and genetic structure of *G. lacustris* were analyzed by microsatellite markers. It was showed that 11 microsatellite loci were polymorphic with different degrees of polymorphism, and the numbers of alleles ranged from 2 to 15, with an average number of  $6 \pm 3.9$  (Table 2). The 11 microsatellite loci were used to analyze the genetic diversity of four populations including Zhanjiang Donghai Island population, Leizhou Jiulong Mountain population, Leizhou Fucheng population and Lianjiang Gaoqiao population. The average number of effective alleles of the four *G. lacustris* populations ranged from 1.919 to 2.485, and the observed heterozygosity and expected heterozygosity distributed at ranges of 0.343 - 0.465 and 0.381 - 0.483, respectively (Table 2). The average polymorphic information content (PIC) ranged from 0.348 to 0.465 (Table 2). Chi-square tests showed that most loci in the 4 *G. lacustris* groups did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ) (Table 3). Linkage disequilibrium analysis was performed in each population and 18 pairs of loci were found to be significantly or very significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) deviated from linkage equilibrium. The genetic differentiation of the 4 populations reached above average level (0.107 - 0.216) (Table 5). Molecular variance analysis (AMOVA) revealed that genetic variation was mainly derived within the population (Table 6).

**Key words:** *Gobiopterus lacustris*; Wild populations; Microsatellites; Genetic diversity

湖栖鳍虾虎鱼 (*Gobiopterus lacustris*) 隶属于鲈形目 (Perciformes) 虾虎鱼亚目 (Gobioidei) 虾虎鱼科 (Gobiidae) 鳍虾虎鱼属, 为暖水性半咸水小型底栖鱼类, 亦可在淡水中生活, 栖息于近岸与河口交汇处或淡水河沟。自 2013 年至 2016 年, 柏琴 (2014) 和张顺等 (2016) 对广东省雷州半岛主要红树林海区进行鱼类资源调查分类及物种多样性研究时, 于雷州半岛东西两岸红树林海域附近的河流入海口或浅滩中均发现有湖栖鳍虾虎鱼的分布。通过对雷州半岛红树林海区鱼类分子分类及多样性研究确定湖栖鳍虾虎鱼为该地区的优势种。湖栖鳍虾虎鱼是我国鳍虾虎鱼属一新记录种, 其体色呈半透明或透明状态, 内部器官清晰可见 (黄承勤等 2018), 具有开发为环境监测指示物种的潜力。雷州半岛红树林海区是湖栖鳍虾虎鱼的主要栖息地之一, 而红树林海区污染日益严重, 红树林不断遭到破坏, 对湖栖鳍虾虎鱼的生存产生威胁, 因此急需对湖栖鳍虾虎鱼展开遗传多样性研究。Wang 等 (2017)

和廖健等 (2017) 利用线粒体 DNA *CO I* 基因和 D-Loop 区对雷州半岛东西两侧的湖栖鳍虾虎鱼进行遗传分化研究, 结果表明, 雷州半岛东、西两侧的湖栖鳍虾虎鱼出现明显的分化现象。

微卫星 (microsatellites) 也叫简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 是由 1~6 个核苷酸为单位构成的串联重复序列 (Li et al. 2017), 具有稳定性好、多态性丰富、引物通用性等特点 (闵金金等 2013)。微卫星标记 (SSR) 广泛分布于真核生物基因组, 是共显性分子标记, 多态性的微卫星标记更能全面地反映物种的遗传多样性。传统的微卫星标记开发方法主要有直接文库筛选法、富集法和近缘种扩增法, 这些方法费时费力、效率低。基于转录组数据开发微卫星标记周期短、效率高、可获得足够丰富的微卫星信息, 并且来源于转录组的微卫星标记与功能基因紧密关联, 可为后续基因的定位、性状关联分析等提供有用信息 (程晓凤等 2011, 王丰等 2019)。利用转录组数据开发

微卫星标记的方法已在动植物中被广泛应用(岳华梅等 2016)。本研究基于湖栖鳍虾虎鱼雌雄性腺转录组数据开发微卫星 DNA 标记,并分析湖栖鳍虾虎鱼的群体遗传多样性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

野生湖栖鳍虾虎鱼样本于 2016 年 5 月至 2017 年 10 月分别采集于雷州半岛 4 个红树林海区,即廉江市高桥镇红树林保护区(N 21°36'24", E 109°47'8", 廉江高桥群体)、湛江东海岛(N 21°06'22", E 110°18'54", 湛江东海岛群体)、雷州市附城镇北家村(N 21°09'00", E 110°17'58", 雷州附城群体)和雷州市九龙山红树林国家湿地公园(N 20°39'51", E 110°17'13", 雷州九龙山群体)。采集的活体样本,带回实验室饲养备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 转录组测序** 雌雄湖栖鳍虾虎鱼各取 3 尾的性腺,利用 Trizol 法提取总 RNA,检测 RNA 的完整性和浓度,将雌雄各 3 个 RNA 样品分别等量混合后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序。通过 Trinity 拼接软件将雌雄性腺转录组测序所得的 clean reads 进行拼接,进一步去冗余、组装后得到大量的 Unigenes。

**1.2.2 微卫星序列的查找及引物设计** 利用 MISA 软件在组装的 Unigenes 序列中搜索微卫星位点。用 Primer 3.0 批量设计程序设计微卫星引物。选取碱基重复数大于 6 的二碱基微卫星位点和大于 5 的三碱基微卫星位点进行引物设计,引物长度限制在 19 ~ 23 bp,扩增产物片段大小限制在 100 ~ 250 bp,退火温度限制在 55 ~ 65 °C。引物委托苏州金唯智生物科技有限公司合成。

**1.2.3 微卫星引物的筛选** 利用天根生化科技(北京)有限公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP324)提取样本肌肉基因

组 DNA。实验用 4 个野生群体各 6 尾个体对 50 对引物进行初筛,PCR 扩增总体积为 10  $\mu$ l,包括 PCR Mix 5  $\mu$ l,上下游引物(5  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ l, DNA 模板 0.5  $\mu$ l(86 mg/L),无菌去离子水补齐至 10  $\mu$ l。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s,退火(温度见表 1) 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 后延伸 5 min。PCR 产物在浓度为 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,银染显色,等位基因大小以 20 bp DNA Ladder Marker 为参照标准进行判读。以出现清晰主带为标准,筛选多态性引物,及引物最适退火温度。

**1.2.4 PCR 扩增与微卫星检测** 委托上海生物工程技术有限公司合成荧光引物,用于湖栖鳍虾虎鱼 4 个群体样本的扩增,每个群体各 32 尾个体。

PCR 扩增总体积为 25  $\mu$ l,包括 PCR Mix 12.5  $\mu$ l,上下游引物(5  $\mu$ mol/L)各 1.0  $\mu$ l, DNA 模板 1.0  $\mu$ l(86 mg/L),无菌去离子水补齐至 25  $\mu$ l。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s,退火(温度依据引物而定) 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 5 min。

每个微卫星位点随机挑 4 个 PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳检测。阳性扩增且条带清晰的 PCR 产物委托上海生物工程技术有限公司进行 STR 检测(3730XL 测序分析仪,美国 ABI 公司)。

**1.2.5 数据分析** 使用 Genemapper 软件对微卫星进行分型(Pan 2010),利用 GenAlEx 6.503 进行遗传分析(Peakall 2006),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( $H_e$ )、Hardy-Weinberg 平衡检验、固定指数( $F_{is}$ )、遗传相似系数( $I$ )、群体间遗传距离( $D_s$ )和分子方差分析(AMOVA)。据 Botstein 等(1980)计算多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)的方法,用 PIC-CALC 软件计算每个微卫星位点的多态性信息含量值。利用 Micro-checker 检测无效等位基因(Oosterhout

et al. 2004)。Popgene32 进行连锁不平衡检测。在 MEGA 6.0.6 软件中基于邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 和非加权配对算术平均法 (average arithmetic using method group pair unweighted, UPGMA) 构建系统发育树 (郭显嵩等 2013)。

## 2 结果

### 2.1 湖栖鳍虾虎鱼转录组中微卫星的数量及特征

通过 Trinity 拼接软件将转录组测序所得的 clean reads 进行混合拼接后获得 232 899 条 transcripts。转录组数据提交国家基因库 CNGBdb-CNSA (登录号: CNP0000359)。将获得的 transcripts 序列进一步去冗余、组装后得到

59 784 条 Unigenes。利用 MISA 软件对 Unigenes 序列进行搜索, 在 17 808 个序列中共得到 25 452 个微卫星。在所有的微卫星中, 单碱基重复微卫星最多, 共有 14 708 个; 其次是 2 碱基重复, 共有 6 175 个, 3、4、5 和 6 碱基重复的分别为 4 223、327、15 和 4 个。

### 2.2 微卫星引物的筛选结果

随机选取的 50 个微卫星位点中, 能够扩增出清晰稳定条带的有 39 个, 其中 11 个位点表现出不同程度的多态性, 其余 28 个位点呈现单态。11 个微卫星位点的特征分析见表 1。

### 2.3 等位基因数和有效等位基因数

11 个微卫星标记在 4 个湖栖鳍虾虎鱼群体中均表现多态 (表 2), 共检测到 71 个等位基因。各位点等位基因数 2~15 个, 平均每个位

表 1 11 对微卫星引物特征

Table 1 Characteristics of 11 pairs of microsatellite primes

位点 Loci	重复类型 Repeat motif	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	退火温度 (°C) Annealing temperature	扩增片段长度 (bp) Size
<i>Gla01</i>	(AT) <sub>10</sub>	GCAATCCATGTGACAAAGGCA AACCAACCAAACGCACGAG	58.0	177 ~ 191
<i>Gla02</i>	(AT) <sub>8</sub>	TTATGGTATGGCTGGCAGGC GCAGGACTCTGGCTCAGTTT	62.0	187 ~ 213
<i>Gla03</i>	(TC) <sub>6</sub>	AGTCAAACGGGGATGGCTTT CTCCCCTCACCCCTTTTTC	62.0	184 ~ 192
<i>Gla04</i>	(TG) <sub>6</sub>	AAACACCCAGCACTCTCCAC GTAGTCCTCAGTTCGGCAC	63.0	116 ~ 122
<i>Gla05</i>	(AT) <sub>6</sub>	TGATCACAATGTTTTGCATCCA TTCAGACCTTACCGTGCCAC	58.0	167 ~ 183
<i>Gla06</i>	(GA) <sub>8</sub>	TGGGGGAATGTTGGGCAAAA GCAGCGGCAACATAAAGAG	55.0	232 ~ 240
<i>Gla07</i>	(TC) <sub>7</sub>	ACTTCTACGCGTTCATTC ACAACATCGAAGAGTGTGAGGA	58.0	129 ~ 139
<i>Gla08</i>	(TC) <sub>7</sub>	TGTCGAGTCCACGAACGTTT CACACTCACCCACAGTCAGT	55.0	207 ~ 223
<i>Gla09</i>	(TTC) <sub>5</sub>	CCTGGGTGAAAAACAGCTGC TCTGTCTCTCCATCTGGG	63.0	175 ~ 187
<i>Gla10</i>	(GCG) <sub>6</sub>	AGTGCTTTATCAAGGGGCC TGCCCTGTTGGTTGAACCTT	61.0	135 ~ 151
<i>Gla11</i>	(ACC) <sub>7</sub>	GTCCTCCACTTCCCCACTG CAAAGCTCTCCACTCCCAG	64.0	142 ~ 157

表 2 11 个微卫星位点在 4 个湖栖鳍虾虎鱼群体中的遗传信息

Table 2 The genetic information of eleven microsatellites in four populations of *Gobiopterus lacustris*

位点 Loci	等位基因数 Number of allele	有效等位基因 Effective number of allele	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 Polymorphic information content
<i>Gla01</i>	8	3.122	0.633	0.680	0.623
<i>Gla02</i>	15	6.723	0.593	0.851	0.836
<i>Gla03</i>	5	2.004	0.398	0.501	0.438
<i>Gla04</i>	4	1.969	0.430	0.492	0.425
<i>Gla05</i>	6	1.193	0.148	0.162	0.159
<i>Gla06</i>	2	1.762	0.398	0.433	0.339
<i>Gla07</i>	2	1.024	0.023	0.023	0.023
<i>Gla08</i>	13	3.744	0.516	0.733	0.692
<i>Gla09</i>	5	1.707	0.386	0.414	0.379
<i>Gla10</i>	6	2.101	0.328	0.524	0.414
<i>Gla11</i>	5	2.113	0.433	0.527	0.422
平均值 Mean	6 ± 3.9	2.496	0.390	0.485	0.432

点的等位基因数为 (6 ± 3.9) 个, 各位点均表现出多态性。Gla07 位点的等位基因数 ( $N_a$ ) 和有效等位基因数 ( $N_e$ ) 等均最低; Gla02 在群体中扩增到的等位基因数最多, 有效等位基因数亦最高。4 个群体的平均有效等位基因在 1.919 ~ 2.485 之间, 廉江高桥群体最高, 雷州附城群体最低 (表 3)。

## 2.4 观测杂合度和期望杂合度

11 个微卫星标记的观测杂合度和期望杂合度在 0.023 ~ 0.633 和 0.023 ~ 0.851 之间 (表 3), Gla01 位点的观测杂合度最大, 而 Gla02 的期望杂合度最大。在 4 个群体中, 平均观测杂合度和期望杂合度的范围分别在 0.343 ~ 0.465 和 0.381 ~ 0.483 之间, 其中, 雷州附城

表 3 4 个湖栖鳍虾虎鱼群体在 11 个位点的遗传信息

Table 3 The genetic information of eleven loci in four populations of *Gobiopterus lacustris*

群体 Population	位点 Loci	等位基因数 Number of allele	有效等位基因 Effective number of allele	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 Polymorphic Information content	哈迪-伯格温平衡 Hardy-Weinberg equilibrium
湛江东海岛 Zhanjiang Donghai Island	<i>Gla01</i>	6	2.713	0.656	0.631	0.570	0.001*
	<i>Gla02</i>	8	7.127	0.607	0.860	0.844	0.052
	<i>Gla03</i>	2	1.983	0.469	0.496	0.373	0.759
	<i>Gla04</i>	3	1.547	0.313	0.354	0.309	0.000*
	<i>Gla05</i>	3	1.099	0.094	0.090	0.088	0.994
	<i>Gla06</i>	2	1.992	0.375	0.498	0.374	0.162
	<i>Gla07</i>	2	1.032	0.031	0.031	0.031	0.928
	<i>Gla08</i>	2	1.753	0.375	0.430	0.337	0.472
	<i>Gla09</i>	4	1.379	0.281	0.275	0.256	0.722
	<i>Gla10</i>	3	1.449	0.313	0.310	0.271	0.973
	<i>Gla11</i>	2	1.992	0.419	0.498	0.374	0.380
平均值 Mean		3 ± 2.0	2.188	0.358	0.407	0.348	

续表 3

群体 Population	位点 Loci	等位基因数 Number of allele	有效等位基因 Effective number of allele	观察杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 Polymorphic Information content	哈迪-伯格温平衡 Hardy-Weinberg equilibrium
雷州九龙山 Leizhou Jiulong Mountain	<i>Gla01</i>	4	2.599	0.500	0.615	0.544	0.345
	<i>Gla02</i>	9	6.364	0.613	0.843	0.824	0.000*
	<i>Gla03</i>	3	1.511	0.344	0.338	0.304	0.859
	<i>Gla04</i>	3	1.994	0.469	0.499	0.403	0.294
	<i>Gla05</i>	2	1.032	0.031	0.031	0.031	0.928
	<i>Gla06</i>	2	1.205	0.188	0.170	0.156	0.558
	<i>Gla07</i>	1	1.000	0.000	0.000	—	—
	<i>Gla08</i>	4	1.979	0.594	0.495	0.431	0.884
	<i>Gla09</i>	4	1.253	0.188	0.202	0.194	0.017*
	<i>Gla10</i>	2	1.679	0.250	0.404	0.322	0.031*
	<i>Gla11</i>	5	2.462	0.594	0.594	0.512	0.761
	平均值 Mean	3 ± 2.0	2.098	0.343	0.381	0.372	
雷州附城 Leizhou Fucheng	<i>Gla01</i>	6	3.442	0.688	0.709	0.660	0.216
	<i>Gla02</i>	12	7.211	0.750	0.861	0.847	0.000*
	<i>Gla03</i>	4	2.805	0.438	0.644	0.576	0.001*
	<i>Gla04</i>	2	1.600	0.500	0.375	0.305	0.059
	<i>Gla05</i>	4	1.294	0.188	0.227	0.216	0.661
	<i>Gla06</i>	2	1.969	0.688	0.492	0.371	0.025*
	<i>Gla07</i>	1	1.000	0.000	0.000	—	—
	<i>Gla08</i>	6	2.040	0.375	0.510	0.460	0.365
	<i>Gla09</i>	4	1.895	0.548	0.472	0.408	0.859
	<i>Gla10</i>	4	2.075	0.438	0.518	0.414	0.703
	<i>Gla11</i>	3	2.002	0.500	0.500	0.390	0.687
	平均值 Mean	4 ± 2.8	2.485	0.465	0.483	0.465	
廉江高桥 Lianjiang Gaoqiao	<i>Gla01</i>	5	2.905	0.688	0.656	0.604	0.939
	<i>Gla02</i>	8	1.811	0.406	0.448	0.434	0.075
	<i>Gla03</i>	4	1.485	0.344	0.327	0.309	0.822
	<i>Gla04</i>	4	2.809	0.438	0.644	0.580	0.000*
	<i>Gla05</i>	4	1.388	0.281	0.279	0.268	0.818
	<i>Gla06</i>	2	1.640	0.344	0.390	0.314	0.501
	<i>Gla07</i>	2	1.064	0.063	0.061	0.058	0.855
	<i>Gla08</i>	7	2.753	0.719	0.637	0.583	0.017*
	<i>Gla09</i>	4	2.488	0.531	0.598	0.540	0.209
	<i>Gla10</i>	5	1.524	0.313	0.344	0.317	0.982
	<i>Gla11</i>	3	1.247	0.219	0.198	0.183	0.923
	平均值 Mean	4 ± 1.8	1.919	0.395	0.416	0.381	

\*为显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.05$ )；“—”为单态位点。

\* denotes extremely significant deviations of Hardy-Weinberg ( $P < 0.05$ ); “—” denotes singleton loci.

群体的观测杂合度和期望杂合度最大，分别为 0.465 和 0.483；雷州九龙山群体的观测杂

合度和期望杂合度最小，分别为 0.343 和 0.381。

## 2.5 多态信息含量与无效等位基因

在本实验的 11 个微卫星位点中, *Gla05* 和 *Gla07* 位点属于低度多态性 (多态信息含量小于 0.25), *Gla01*、*Gla02* 和 *Gla08* 为高度多态位点 (多态信息含量大于 0.50), 其余的属于中度多态位点 (多态信息含量介于 0.25 与 0.50 之间) (表 2)。Micro-checker 检测发现, *Gla02* 位点在湛江东海岛和雷州九龙山群体、*Gla03* 位点在雷州附城群体以及 *Gla04* 位点在廉江高桥群体中存在无效等位基因。其余位点在各个群体中均不存在无效等位基因。

## 2.6 Hardy-Weinberg 平衡与连锁不平衡分析

经 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验, 在 4 个群体 11 个多态微卫星位点中大部分未偏离平衡状态 ( $P > 0.05$ )。湛江东海岛和廉江高桥群体有 2 个位点偏离平衡, 雷州九龙山和雷州附城群体有 3 个位点偏离平衡 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。

在每个群体中进行连锁不平衡分析, 18 对位点间显著或者非常显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) 偏离连锁平衡。在雷州附城群体中出现最多, 共 8 对连锁不平衡 (*Gla01/Gla05*、*Gla01/*

*Gla08*、*Gla01/Gla11*、*Gla02/Gla05*、*Gla05/Gla08*、*Gla05/Gla011*、*Gla08/Gla10*、*Gla08/Gla11*), 湛江东海岛群体中出现 4 对连锁不平衡 (*Gla01/Gla09*、*Gla02/Gla07*、*Gla05/Gla09*、*Gla07/Gla09*), 雷州九龙山和廉江高桥群体相对最少, 各有 3 对连锁不平衡 (雷州九龙山群体: *Gla02/Gla05*、*Gla02/Gla11*、*Gla05/Gla11*; 廉江高桥群体: *Gla02/Gla08*、*Gla02/Gla10*、*Gla09/Gla10*)。

## 2.7 群体间遗传分化分析

利用 GenAlEx 6.503 软件计算得到了 4 个群体间的 Nei 遗传距离  $D_s$  和遗传相似系数  $I$  (表 4)。廉江高桥和湛江东海岛、雷州附城群体间的遗传距离最大, 遗传相似系数最小; 廉江高桥和雷州九龙山群体间的遗传距离最小, 遗传相似系数最大。4 个群体间的遗传距离为 0.110 ~ 0.233。根据 Nei 遗传距离采用邻接法和 UPGMA 法对 4 个群体进行聚类分析, 湛江东海岛和雷州附城群体先聚为一支, 而雷州九龙山和廉江高桥群体聚为另一支 (图 1, 仅列出邻接图)。

表 4 湖栖鳍虾虎鱼 4 个群体间的 Nei 遗传距离 (对角线以下) 和遗传相似系数 (对角线以上)

Table 4 The Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among four populations of *Gobiopterus lacustris*

群体 Population	湛江东海岛 Zhanjiang Donghai Island	雷州九龙山 Leizhou Jiulong Mountain	雷州附城 Leizhou Fucheng	廉江高桥 Lianjiang Gaoqiao
湛江东海岛 Zhanjiang Donghai Island	–	0.891	0.891	0.792
雷州九龙山 Leizhou Jiulong Mountain	0.116	–	0.856	0.896
雷州附城 Leizhou Fucheng	0.116	0.155	–	0.792
廉江高桥 Lianjiang Gaoqiao	0.233	0.110	0.233	–

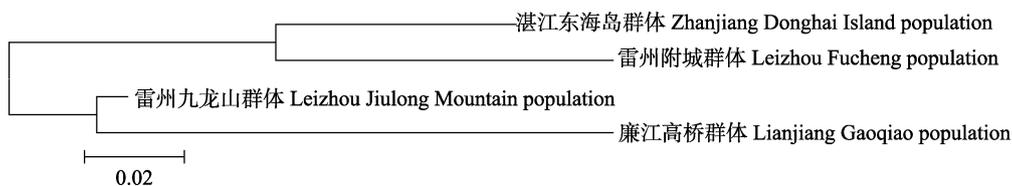


图 1 基于 Nei 遗传距离构建的 4 个湖栖鳍虾虎鱼群体的邻接聚类树图

Fig. 1 Neighbor-joining dendrogram of four *Gobiopterus lacustris* populations based on Nei's genetic distance

标尺为遗传距离。Bar is the genetic distance.

种群的遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) 表明种群遗传分化的水平, 在 0 ~ 0.05 间表明该种群遗传分化很弱, 在 0.05 ~ 0.15 间的种群遗传分化处于中等水平, 而在 0.15 ~ 0.25 间表明种群的遗传分化较大, 若大于 0.25 则说明种群的遗传分化很大。本实验中湖栖鳍虾虎鱼 4 个野生群体的遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) 值见表 5, 廉江高桥群体与湛江东海岛群体遗传分化较大; 其他群体间的遗传分化也都达到了中等水平。AMOVA 分析表明, 75% 的遗传变异源于群体内, 25% 的变异来自群体间 (表 6)。

### 3 讨论

基因杂合度是反映群体遗传多样性高低的主要参数, 也是度量群体遗传变异的一个最适参数, 而位点平均杂合度近似反映遗传结构变异程度的高低 (秦海峰等 2014)。本研究湛江东海岛、雷州九龙山、雷州附城和廉江高桥 4 个群体的平均观测杂合度和平均期望杂合度均低于小长臀虾虎鱼 (*Pomatoschistus minutus*) (Yang et al. 2015) 和微体玻璃虾虎鱼 (*Aphia minuta*) (Ruggeri et al. 2013)。这可能与物种差异、地理分布以及存在无效等位基因而导致杂合子缺失有关。

多态信息含量 (PIC) 是衡量一个遗传标记多态性所含信息量的指标, 能反映出某个标记所包含或提供的遗传信息容量。多态性信息含量越大, 在一个群体中该座位杂合子比例会越大, 提供的遗传信息就越多 (田艳琴等 2010, 贾舒雯等 2011)。杂合度 ( $H$ ) 与多态信息含量 (PIC) 都能反映群体内个体遗传变异程度, 数值越高说明遗传变异越大, 反之遗传变异越小。本研究中 3 个微卫星位点的多态信息含量 (PIC) 大于 0.50, 为高度多态性; 6 个位点多态信息含量 (PIC) 介于 0.25 和 0.50 之间, 为中度多态性; 其余 2 个位点多态信息含量 (PIC) 小于 0.25, 为低度多态性。11 个微卫星位点的多态信息含量 (PIC) 平均值为 0.43, 可见湖栖鳍虾虎鱼维持着较好的遗传多样性。湛江东海岛、雷州九龙山、雷州附城和廉江高桥 4 个群体的平均多态信息含量 (PIC) 值分别为 0.348、0.372、0.465 和 0.381, 雷州附城群体的平均 PIC 值最高, 相应的  $H_o$  和  $H_e$  也是 4 个群体中最高的, 说明雷州附城群体的遗传变异比其他 3 个群体大, 这与 Wang 等 (2017) 利用 D-Loop 和 CO I 研究湖栖鳍虾虎鱼在雷州半岛东西两岸的遗传分化的结果相一致。

遗传距离是用来估计不同种群之间遗传分

表 5 4 个湖栖鳍虾虎鱼群体的遗传分化指数

Table 5 Genetic differentiation indices in four populations of *Gobiopterus lacustris*

群体 Population	湛江东海岛 Zhanjiang Donghai Island	雷州九龙山 Leizhou Jiulong Mountain	雷州附城 Leizhou Fucheng
雷州九龙山 Leizhou Jiulong Mountain	0.129		
雷州附城 Leizhou Fucheng	0.107	0.148	
廉江高桥 Lianjiang Gaoqiao	0.216	0.121	0.190

表 6 4 个湖栖鳍虾虎鱼群体的 AMOVA 分析

Table 6 Analysis on molecular variance (AMOVA) among four populations of *Gobiopterus lacustris*

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分比 (%) Percentage variation
群体间 Among populations	3	180.285	1.717	25
群体内 Within populations	124	638.540	5.150	75
合计 Total	127	818.825	6.867	100

化程度的一个指标, 根据其大小可以确定群体间亲缘关系的远近。遗传距离越大, 亲缘关系越远, 遗传距离越近, 亲缘关系越近(程雪艳等 2015)。本研究根据 Nei 指数法对湖栖鳍虾虎鱼 4 个群体的遗传结构进行遗传距离和遗传相似性统计分析, 结果表明廉江高桥和雷州九龙山群体间的遗传距离最小(0.110), 遗传相似系数最大(0.896), 聚为一支, 其次是雷州附城和雷州九龙山群体聚为一支。4 个群体间遗传分化与亲缘关系并不完全符合地理分布的特征, 尤其是雷州半岛东侧雷州九龙山群体与湛江东海岛和雷州附城群体出现了遗传分化, 分析原因可能是雷州九龙山群体与湛江东海岛和雷州附城群体间有南渡河入海口相隔, 而湖栖鳍虾虎鱼是小型底栖鱼类, 难以越过河流入海口的急流; 九龙山群体位于广东雷州九龙山红树林国家湿地公园, 受外界干扰较小, 可能保留了某些稀有等位基因, 而湛江东海岛和雷州附城群体周围均有水产养殖产业, 人为干扰和环境污染对其影响较大。与雷州半岛弹涂鱼(*Periophthalmus modestus*)的群体遗传分化特征相类似(张顺 2017)。遗传分化指数( $F_{st}$ )是反映种群间遗传分化程度的重要指标。湖栖鳍虾虎鱼 4 个群体间的遗传分化指数在 0.107 ~ 0.216 之间, 其中廉江高桥群体与湛江东海岛群体  $F_{st}$  值为 0.216, 遗传分化达到了较大的水平; 其次是廉江高桥群体与雷州附城群体的遗传分化达到了中等水平( $F_{st} = 0.190$ ); 其他群体间的遗传分化也都达到了中等水平。这主要是因为廉江高桥与湛江东海岛和雷州附城群体位于雷州半岛东西两侧而存在地理隔离, 所以遗传分化水平较高, 这与 Wang 等(2017)对该物种遗传分化水平的研究结果相一致。AMOVA 分析表明, 75%的遗传变异源于群体内, 25%的变异来自群体间, 表明群体内的遗传变异是引起种群总体变异的主要因素, 这也与廖健等(2017)利用 D-Loop 分析湖栖鳍虾虎鱼遗传变异的研究结果相一致。

#### 4 湖栖鳍虾虎鱼物种保护

本研究基于转录组数据开发获得的微卫星标记, 有助于从分子水平上对雷州半岛两侧湖栖鳍虾虎鱼的遗传背景进行分析。研究表明, 雷州半岛 4 个群体的遗传分化达到了中等水平以上。面对这一状况, 我们应加强对湖栖鳍虾虎鱼种质资源的保护。针对近年来由于红树林海区环境污染日益严重, 红树林不断被毁坏, 加上入侵种食蚊鱼(*Gambusia affinis*)在食物与栖息地上的竞争, 应当重视水环境污染的治理与预防, 严禁破坏红树林, 对被严重破坏的区域进行种植恢复, 对于入侵种食蚊鱼需定时监测, 防止其进一步威胁湖栖鳍虾虎鱼的生存, 使湖栖鳍虾虎鱼得到有效保护, 种质资源得到合理的可持续性利用。湖栖鳍虾虎鱼是雷州半岛红树林海区的优势种, 常年生活在红树林海区, 其特殊的形态特征, 体色呈无色透明, 内部器官清晰可见, 具有开发为雷州半岛红树林海区环境监测指示物种的潜力, 进而对该地区的环境污染情况进行监测。

#### 参 考 文 献

- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314-331.
- Li H, Ruan C J, Wang L, et al. 2017. Development of RNA-seq SSR markers and application to genetic relationship analysis among sea buckthorn germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 142(3): 200-208.
- Oosterhout C V, Hutchinson W F D, Wills D, et al. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3): 535-538.
- Pan Y B. 2010. Databasing molecular identities of Sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1(2): 8.
- Peakall R, Smouse, P E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in

- Excel Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288–295.
- Ruggeri P, Splendiani A, Giovannotti M, et al. 2013. Isolation and characterisation of novel microsatellite loci in the transparent goby *Aphia minuta* (Perciformes, Gobiidae). *Conservation Genetics Resources*, 5(3): 775–777.
- Wang Z D, Liao J, Huang C Q, et al. 2017. Significant genetic differentiation of *Gobiopterus lacustris*, a newly recorded transparent goby in China. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 29(5): 785–791.
- Yang M, Peng Q, Jiang L, et al. 2015. Development and characterization of nine polymorphic microsatellite markers for the blue sheep (*Pseudois nayaur*). *Conservation Genetics Resources*, 7(1): 183–185.
- 柏琴. 2014. 雷州半岛东部红树林海区鱼类的分子分类研究. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文.
- 程晓凤, 黄福江, 刘明典, 等. 2011. 454 测序技术开发微卫星标记的研究进展. *生物技术通报*, (8): 82–90.
- 程雪艳, 滕爽爽, 肖国强, 等. 2015. 基于微卫星的泥蚶 5 个地理群体遗传多样性分析. *海洋科学*, 39(11): 116–125.
- 郭昱嵩, 颜程钟, 张宇岚, 等. 2013. 多鳞鱧 (*Sillago sihama*) 4 个野生地理群体的微卫星标记分析. *海洋与湖沼*, 44(2): 267–276.
- 黄承勤, 廖健, 张顺, 等. 2018. 中国鳍虾虎鱼属(鲈形目: 虾虎鱼科)一新纪录种. *广东海洋大学学报*, 38(2): 1–6.
- 贾舒雯, 刘萍, 韩智科, 等. 2011. 脊尾白虾微卫星富集文库的构建与多态性标记的筛选. *水产学报*, 35(12): 1787–1794.
- 廖健, 龙水生, 贺亮, 等. 2017. 基于 *COI* 基因和 D-loop 区部分序列比较雷州半岛东、西岸湖栖虾虎鱼群体的遗传多样性. *海洋科学*, 41(2): 103–110.
- 闵金金, 张加勇, 郑荣泉, 等. 2013. 跨种扩增筛选大鳄龟微卫星标记及遗传多样性分析. *动物学杂志*, 48(6): 926–932.
- 秦海峰, 龙宁, 吴建国, 等. 2014. 甜叶菊微卫星富集文库的构建与多态性标记的筛选. *作物学报*, 40(3): 447–456.
- 田艳苓, 毕伟伟, 杨海玲, 等. 2010. 济宁百日鸡群体遗传多样性的微卫星标记分析. *经济动物学报*, 14(1): 41–45.
- 王丰, 张猛, 沈玉帮, 等. 2019. 青鱼微卫星标记的开发与特性分析. *动物学杂志*, 54(1): 60–68.
- 岳华梅, 翟晴, 宋明月, 等. 2016. 基于转录组测序的兴国红鲤微卫星标记筛选. *淡水渔业*, 46(1): 24–28.
- 张顺. 2017. 雷州半岛红树林区弹涂鱼类种群生物学特征与遗传多样性的研究. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文.
- 张顺, 廖健, 柏琴, 等. 2016. *COI* 条形码辅助分析雷州半岛红树林区鱼类的物种多样性. *海洋与湖沼*, 47(3): 663–672.