

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.08.002

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)浙江岱衢族养殖群体 与福建闽—粤东族群体遗传多样性分析^①

刘 洋¹, 武祥伟^{1,2}, 吴雄飞³,
薛良义⁴, 肖世俊¹, 王志勇¹

1. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;
2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 昆明 650100;
3. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012; 4. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘要: 为了解浙江(宁波)养殖岱衢族大黄鱼与福建闽粤东族大黄鱼群体的遗传差异, 利用 5 对 AFLP 引物和 14 对微卫星(SSR)标记对宁波 2 个岱衢族大黄鱼养殖群体与福建官井洋野生和养殖群体进行了比较研究。研究发现: AFLP 选择性扩增引物在 4 个群体中共扩增出 244 个清晰的条带, 岱衢族养殖群体(NBB)的多态位点比例最低, 为 54.51%, 其余 3 个群体则均在 63% 左右。微卫星引物分析出 4 群体平均等位基因数在 6.00~8.36 之间, 观测杂合度为 0.68~0.78, 期望杂合度只有岱衢洋野捕群体的 F_1 代(NBA)群体为 0.75, 其余群体均大于 0.80。基于 AFLP 和 SSR 数据计算群体间遗传相似系数和遗传距离进行聚类分析, 结果均显示, 官井洋野生群体(GJY)与养殖群体(FJ)在遗传上最为相似, 聚类为一支, 宁波养殖的 2 个群体(NBA, NBB)聚类为另外一支。综合 4 群体的各方面遗传差异参数可知, 福建 2 个群体的遗传多样性比宁波 2 个养殖群体的略高。观察其三维散点聚类图和最小进化树均可发现, NBA 群体的遗传结构与其他 3 个群体明显不同, 并发现福建野生群体中有 2 个个体应属于福建养殖群体后代。

关 键 词: 大黄鱼; AFLP; SSR; 遗传多样性

中图分类号: S917; Q595.483

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)08-0006-07

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)作为我国主要的海洋经济鱼类, 在上世纪七十年代以前曾是我国近海捕捞量最大的鱼类, 也是现今育苗养殖量最大的海洋鱼类, 素有“海水国鱼”之称, 营养丰富、肉质鲜美, 其耳石、鳔、精巢等均是重要药物和制药原料^[1-2]。但过度捕捞导致大黄鱼野生资源急剧减少, 而产业化养殖在创造巨大的社会效益和经济效益的同时也带来了种质退化和疾病频发等一系列问题^[3], 因而遗传改良和遗传资源管理工作日显重要。AFLP 与微卫星(SSR)标记因其数量多、多态性高, 不受发育时期、季节和环境条件影响等优点, 在水生生物中得到广泛应用, 也成为鱼类群体遗传多样性和遗传差异分析的最有效手段之一^[4]。有研究者利用不同分子标记技术对大黄鱼群体遗传多样性、遗传结构进行了一些分析和研究, 如王志勇等^[5]利用 AFLP 技术分析了官井洋野生和养殖大黄鱼群体的多态性; 丁诗华等^[6]研究了岱衢洋和官

① 收稿日期: 2014-04-18

基金项目: 国家“863”计划项目(2002AA10A403); 福建省高校产学研重大专项(2011N5010)。

作者简介: 刘 洋(1986-), 女, 黑龙江肇东县人, 硕士研究生, 主要从事水产生物遗传育种研究。

通信作者: 王志勇, 教授, 博士研究生导师。

井洋养殖群体的遗传差异; Wu 等^[7]运用微卫星标记分析了浙江和福建的野生和养殖大黄鱼群体间的遗传结构差异。2007年,浙江省宁波市海洋与渔业研究院从岱衢洋捕捞了一批野生大黄鱼,经驯养,部分个体(4雌4雄)得以存活并经人工繁殖获得了子代,形成了一个新的养殖群体(NBA)。但对其遗传多样性以及与其他养殖群体的遗传关系尚缺乏研究。本文利用 AFLP 和 SSR 这 2 种分子标记技术,对该群体以及由宁波大学于 2001 年从岱衢洋采捕野生大黄鱼经过多代人工繁育的养殖群体(NBB),与福建闽—粤东族养殖群体和野生群体进行研究比较,以期更全面了解现有养殖大黄鱼遗传资源情况,为进一步有效开展大黄鱼良种选育、人工增殖放流和遗传资源管理保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源及基因组 DNA 的提取

NBA 群体系为宁波市海洋与渔业研究院 2007 年在岱衢洋采捕的野生大黄鱼人工繁育的 F₁ 代(22 尾); NBB 是宁波大学 2007 年提供的“岱衢族”大黄鱼养殖群体标本(10 尾); GJY 群体是 2008 年采捕自官井洋东冲口外海区(三沙湾)的野捕大黄鱼标本(15 尾); FJ 群体则为本课题组采集的福建养殖大黄鱼(宁德,福鼎,连江)标本(15 尾)。采用北京天根生化科技有限公司的试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒)和常规酚/氯仿法从固定于 95%乙醇的鳍条提取基因组 DNA,提取的基因组 DNA 保存在 TE 中,置于 4 ℃待用。

1.2 AFLP 指纹图谱的构建和微卫星标记的反应

AFLP 指纹图谱利用 GIBCO BRL 的 AFLP 分析试剂盒(AFLPTM Analysis system I)构建,具体操作方法与反应试剂详见文献[8—9]。依据 Ning 等^[9]的研究设计引物,对 6 种 EcoR I 引物和 6 种 Mse I 引物,共 36 个引物组合进行筛选,选择扩增条带清晰,多态性高的引物 5 对选择性扩增引物(E-AAC/M-CAA, E-AGC/M-CAA, E-ACG/M-CTT, E-ACC/M-CAT, E-AGA/M-CAC)进行 AFLP 分析。

本研究使用的微卫星引物均由本实验室开发^[9—11],引物序列、退火反应条件等见表 1。反应使用的试剂、操作流程及反应条件详见文献[10—11]。

1.3 数据分析

使用 POPGEN Version 1.32 软件统计各群体、各座位的遗传参数^[12],利用等位基因频率的数据在 PIC_CALC 程式中计算多态信息含量(PIC),利用 Nei's 无偏估计方法计算遗传距离、遗传相似系数,再以 UPGMA 算法进行群体聚类分析^[13]。根据 AFLP 计算的遗传距离数据在 MEGA4.0 中进行以个体为单位的聚类分析^[14]。另外利用 Genetix 程序对微卫星标记数据进行因子相关分析(FCA 分析)构建所有个体三维立体分布图^[15]。

2 结 果

2.1 群体遗传多样性差异分析

所选 5 对 AFLP 选择性扩增引物在 4 个群体 62 个个体中共扩增出 244 个清晰的片段,大小在 88~350 bp 之间;各群体检出的片段数量、多态性位点比例等指数如表 2 所示。从表 2 可知,4 个群体中遗传多样性以 NBB 群体最低,GJY 群体的遗传多样性最为丰富,如 NBB 群体多态位点比例只有 54.51%,其余 3 个群体均在 63% 左右。

14 对微卫星引物在 4 个群体中共扩增出 174 个等位基因(条带),片段大小在 71~284 bp 之间;每个位点等位基因数为 7~17,4 个群体平均等位基因数为 6.00~8.36,平均观测杂合度在 0.68~0.78 之间,以 NBB 群体最低,FJ 群体最高;平均有效等位基因数为 4.15~5.62,平均期望杂合度和平均多态信息含量则是 NBA 群体最低,GJY 群体最高(表 3)。

2.2 群体间的亲缘关系与遗传分化

根据 AFLP 和 SSR 检测结果计算的群体间相似系数与遗传距离分别见表 4 和表 5。如表所示, GJY 群体与 FJ 群体最为相似, 遗传距离最小, 宁波 2 个群体与福建 2 个群体之间的基于 SSR 标记的遗传距离(>0.51)均明显大于两地区内群体间的遗传距离(<0.48)。4 个群体间 AFLP 相似系数变化在 0.930 9~0.953 5 之间, 遗传距离为 0.047 7~0.071 6。基于 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 亲缘关系图结果显示(图 1, 图 2), 4 个大黄鱼群体聚成 2 支, NBA 与 NBB 聚成一支, GJY 与 FJ 聚成一支。

利用 SSR 的结果对 4 个群体进行因子相关分析(FCA 分析)构建的散点图显示(图 3), NBA 与 NBB 分别呈独立分布, GJY 与 FJ 混合分布(图 3-A), 只有在三维立体图(图 3-B)中 GJY 与 FJ 才可区分, 但 GJY 群体中有 2 个个体明显分布在 FJ 群体的立体空间中。以 4 个群体的个体间 AFLP 遗传距离构建最小进化树(图 4), 其结果也是 GJY 群体有 2 个个体聚到 FJ 群体内, 其余个体均以所在群体为单位聚类到同一区域。

表 1 14 个大黄鱼微卫星标记核心序列、引物序列和退火温度

引物名称	核心序列	引 物 序 列	退火温度/℃
LYC0002	(TG) ₂ (AC) ₂ • (AC) ₁₀ • (AC) ₅	F: ACCTCCAGTGGGATGTGA R: GGCTGTTGTTATAATTGTG	50
LYC0009	(GT) ₁₀ TTA(TG) ₄ CTG	F: GTCAATCACGTCTGTCTCTGC R: TCAGCCATTGTCTGTGAGGT	60
LYC0010	(TG) ₁₉	F: GTCTCAGCTGACTCCTGCTTC R: ATGGCTCTAACATGGTAGG	55
LYC0011	(TG) ₁₁	F: CTTTATTGGCTCCGTATGA R: CACTCACACTAGCACGCAC	55
LYC0013	(GT) ₂₈	F: GCTGCGAGCTACTTTACTCAT R: AACTCACAAACATGCA	50
LYC0015	(AC) ₇ •••(AC) ₂	F: ACAGTCTAAAGCTGCCAGCA R: TGAGACCAACCACATTCTGT	55
LYC0016	(GT) ₃ •••(GT) ₁₁ A(TG) ₄	F: GAGCCTTGTGTGGTGAGCA R: GAAAACCCAGACCGTATTGT	55~50
LYC0082	(TG) ₁₉	F: GCAACAACCCCTCCTCTGA R: AGCGAGTCCAGCCACTAA	55
LYC0088	(AAG) ₂₀	F: TAAGTAGTACCTGAAGGCAACA R: GCAGGAAATAATGGAGGC	60
LYC0134	(CA) ₂₂	F: CGGGAAATGTCATTAGCA R: GAGCGAAATTGAAAGTAG	51
LYC0200	(AC) ₁₆	F: GAGATGAGGGATAAGTGC R: ATAGTCCCATTAGGATACA	55
LYC0401	(AGA) ₉	F: TCCGAGATGAAGTAAAGTC R: ACTCCTTCGAGTCCATAA	58
LYC0406	(AC) ₇ G(CA) ₈	F: TCTCGGGCAAATTGGTTT R: CTGTGGCAGGAAGAAAA	54
LYC0414	(TG) ₂₈	F: CCTTCAGAATAAAGTGGTT R: AAGGGGTCAGCACAAACAC	52

表2 5对AFLP选择性扩增引物检出的4个大黄鱼群体的遗传多样性参数

群体	样本数/ 尾	检出片段	多态位点 比例/%	Nei遗传多 样性指数	Shannon多 样性指数
NBA	22	225	63.11	0.20	0.31
NBB	10	206	54.51	0.18	0.27
GJY	15	221	63.93	0.21	0.32
FJ	15	218	63.11	0.21	0.32
Mean		217.5	61.17	0.20	0.31

表3 4个大黄鱼群体的微卫星遗传多样性参数

群体	样本数/ 尾	平均等位 基因数 Na	平均有效等位 基因数 Ne	平均观测 杂合度 Ho	平均期望杂 合度 He	平均多态信 息含量 PIC
NBA	22	7.86	4.15	0.72	0.75	0.70
NBB	10	6.00	4.39	0.68	0.80	0.72
GJY	15	7.86	5.62	0.73	0.83	0.78
FJ	15	8.36	5.36	0.78	0.82	0.77

表4 4个大黄鱼群体基于AFLP检测的Nei遗传相似性系数及遗传距离

群体	NBA	NBB	GJY	FJ
NBA	* * * *	0.951 1	0.953 1	0.945 8
NBB	0.050 2	* * * *	0.942 4	0.930 9
GJY	0.048 0	0.059 3	* * * *	0.953 5
FJ	0.055 7	0.071 6	0.047 7	* * * *

注: * 对角线以下为遗传距离数; * 对角线上为相似系.

表5 4个大黄鱼群体基于SSR检测的Nei遗传相似性系数及遗传距离

群体	NBA	NBB	GJY	FJ
NBA	* * * *	0.622 2	0.583 0	0.598 5
NBB	0.474 5	* * * *	0.524 9	0.571 0
GJY	0.539 6	0.644 6	* * * *	0.783 4
FJ	0.513 3	0.560 3	0.244 1	* * * *

注: * 对角线以下为遗传距离数; * 对角线上为相似系.

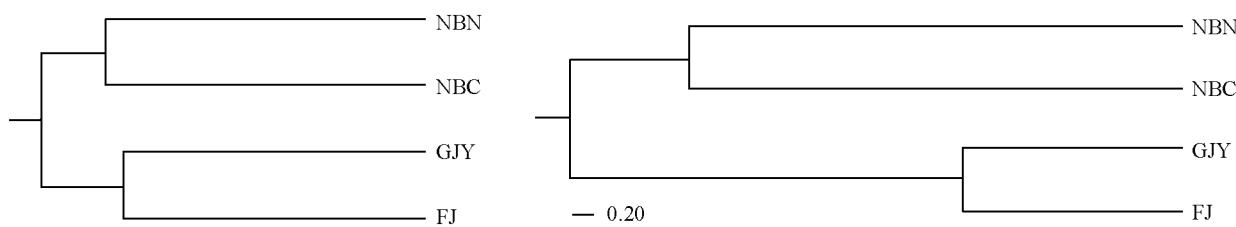
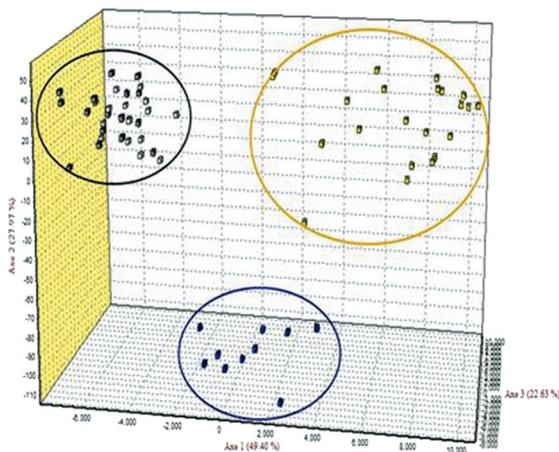
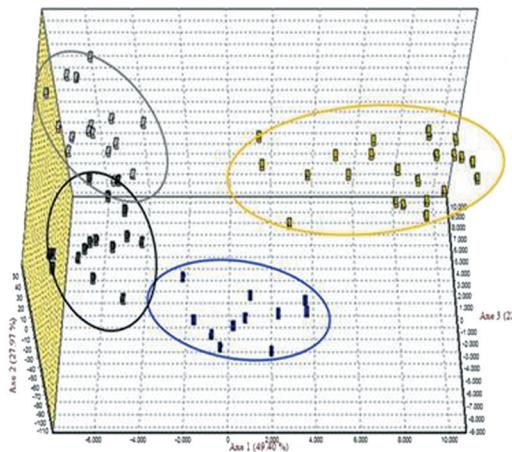


图1 基于AFLP构建的
4个大黄鱼群体的UPGMA树

图2 基于SSR标记构建的
4个大黄鱼群体的UPGMA树



A. 62尾大黄鱼三维聚类图平面观



B. 62尾大黄鱼三维聚类图立体观

图 3 依据 3 个主要影响因子构建的大黄鱼个体间三维聚类图

3 讨 论

群体遗传多样性可以影响群体的适应性和选育潜力, 大黄鱼官井洋野生和养殖群体以及宁波大学选育的岱衢族养殖群体(NBB 群体)的遗传多样性此前均有研究报道^[5, 7], 只有 NBA 群体的遗传多样性情况则尚未研究。从本研究结果看, 对 4 个群体样品用 5 对 AFLP 选择性引物进行检测, 多态位点比例均在 54% 以上; 对 14 个 SSR 位点检测的结果、三群体平均多态信息含量、平均期望杂合度、平均观测杂合度均与王文文等^[16]的研究结果基本一致。NBA 群体 AFLP 多态位点比例为 63.11%, 高于 NBB 群体, 与 FJ 群体相当; 14 个 SSR 位点的平均多态信息含量为 0.70, 平均期望杂合度为 0.75, 略低于 NBB 群体, 平均观测杂合度为 0.72, 高于 NBB 群体。表明 NBA 群体也具有良好的遗传多样性, 具有较大的选育潜力, 可以单独进行选育形成独特的品系。总体上, 无论是 AFLP 检测结果还是 SSR 检测结果, 福建群体的遗传多样性均高于宁波群体, 显示福建 2 个群体的选育潜力要高于宁波 2 个群体。

目前福建省、广东省和浙江省养殖的大黄鱼苗种绝大部分来自福建, 其奠基亲本均来自官井洋外海域(三沙湾)。尽管这些群体已是经过连续多代人工繁育的后代, 但从本研究结果看, 其与近期从三沙湾采捕的野生标本(本研究中的 GJY 群体)仍然保持着最近的亲缘关系, 相似系数最大, 遗传距离(代表着遗传分化)最小, 在利用 AFLP 与 SSR 标记分析的结果中, 均首先聚为一支; 而 NBA 和 NBB 这 2 个群体则聚合为另外一支(图 1—图 4)。NBA 群体与 NBB 亲缘关系最近, 但利用 AFLP 与 SSR 数据都可以将 2 个群体的每个个体明确分群(图 3—图 4); 而与福建的养殖与野捕群体则都具有较大的遗传差异。因此在管理上, 可将 NBA 和 NBB 分别独立管理; 在育种中, 可考虑将 FJ, NBA, NBB 3 个群进行杂交, 特别是宁波群体与福建群体之间的杂交, 可能获得较好的效果。

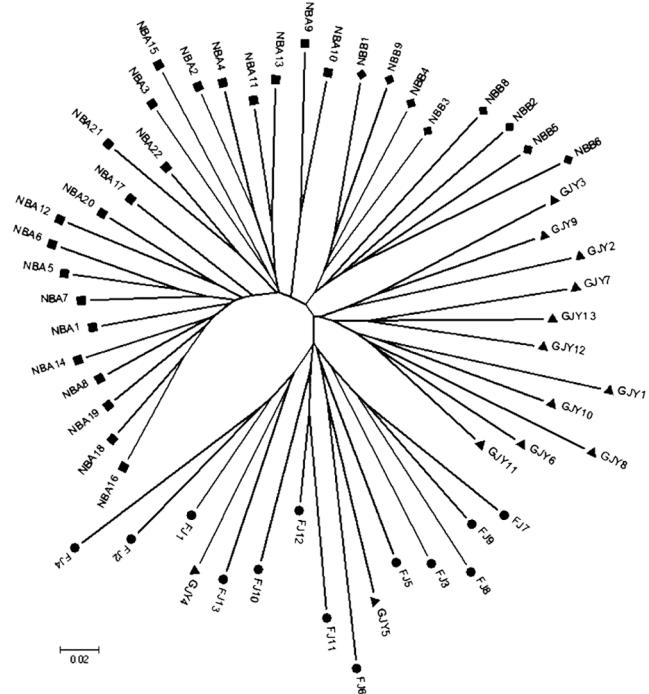


图 4 基于 5 对引物 AFLP 遗传距离的最小进化树(ME)

本研究5对AFLP引物在官井洋野生与养殖大黄鱼群体多态片段比例(分别为63.93%和63.11%)均低于王志勇等^[5]在2002年报道的官井洋野生和养殖群体的多态片段比例(76.6%和69.9%),表明其遗传多样性都在下降,与之相一致的是,近年来福建养殖大黄鱼发病率持续上升,养殖成活率显著下降。因此,对福建(官井洋)野生大黄鱼应该加强保护工作,对福建养殖大黄鱼进行繁育时,应注意从不同群体选择具有异质性的亲本进行混合繁殖。另一方面,本研究结果显示(表3),4个群体平均观测杂合度均低于平均期望杂合度,说明4个群体都有不同程度的杂合子缺失,尤其以NBB群体为甚。杂合子缺失通常是由部分基因位点纯合固定导致,可能与其连续多代较高强度的人工选育以及每个世代繁育时使用的亲本数量较少有关。严重的杂合子缺失,会导致后续繁殖中一些等位基因的丢失,影响到群体的适应性及继续选育的潜力,因此在选育工作中需要引起注意。此外,本研究结果显示(图3,图4),无论是在SSR还是AFLP数据聚类分析中,GJY群体中有2个个体(GJY4和GJY5)与FJ群体个体之间具有很高的遗传相似性,显然,这2个个体很可能是来源于FJ群体,即福建养殖大黄鱼群体中的逃逸或放流个体。近年来大黄鱼人工放流受到国家和福建省与浙江省政府的高度重视,但由于放流的大黄鱼难以进行物理标识追踪,使得人工放流效果的评价成为一个难题。本研究结果表明,AFLP与SSR技术均可以用于对大黄鱼进行准确的来源群体识别和对人工放流大黄鱼进行分子追踪分析,因而可以用于大黄鱼人工放流效果评价的工作。

参考文献:

- [1] 朱元鼎.福建鱼类志[M].福州:福建科学技术出版社,1985,130—133.
- [2] 范宏东.闽东大黄鱼产业现状及发展对策[J].现代农业科技,2009(10):213—214.
- [3] 张其永,洪万树,杨圣云,等.大黄鱼地理种群划分的探讨[J].现代渔业信息,2011,26(2):3—8.
- [4] 姚一彬,刘巧林,周伟,等.DNA分子标记及其在水产动物研究中的应用[J].湖南饲料(应用研究),2011,6:14—21.
- [5] 王志勇,王艺磊,林利民,等.福建官井洋大黄鱼AFLP指纹多态性的研究[J].中国水产科学,2002,9(3):198—202.
- [6] 丁诗华,黄丽英,张海琪,等.大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)岱衢洋选育群体和官井洋养殖群体的遗传差异分析[J].海洋与湖沼,2006,37(1):41—46.
- [7] WU Xiang-wei, LIU Xian-de, CAI Ming-yi, et al. Genetic Analysis of Farmed and Wild Stocks of Large Yellow Croaker *Larimichthys crocea* by Using Microsatellite Markers [J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(30): 5773—5784.
- [8] WANG Zhi-yong, JAYASANKAR P, KHOO S K, et al. AFLP Fingerprinting Reveals Genetic Variability in Common Carp Stocks from Indonesia [J]. Asian Fisheries Science, 2000(13): 139—147.
- [9] YUE Ning, LIU Xian-de, WANG Zhi-yong, et al. A Genetic Map of Large Yellow Croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. Aquaculture, 2007, 264: 16—26.
- [10] 叶华.大黄鱼SSR遗传连锁图谱的构建及生长相关性状的QTL定位[D].长沙:湖南农业大学,2009.
- [11] 叶华,刘洋,刘贤德,等.大黄鱼微卫星标记与生长性状的相关分析[J].西南大学学报:自然科学版,2014,36(3):1—7.
- [12] YEH F C, YANG R, BOYLE T. PopGene, Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.31. University of Alberta, Centre for International Forestry Research, Canada, 1999.
- [13] NEI M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583—590.
- [14] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596—1599.
- [15] BELKHIR K, BORSA P, CHIKHI L, et al. Genetix 4.05, Logiciel Sous Windows TM Pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, University de Montpellier II, Montpellier, France, 2004.
- [16] 王文文,常玉梅,梁利群.微卫星分析四个大黄鱼群体的遗传多样性[J].水产学杂志,2009,22(2):6—11.

Analysis of Genetic Diversity in Cultured Populations of DaiQu and Min-Yue Groups of *Larimichthys crocea*

LIU Yang¹, WU Xiang-wei^{1,2}, WU Xiong-fei³,
XUE Liang-yi⁴, XIAO Shi-jun¹, WANG Zhi-yong¹

1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea (Ministry of Agriculture)

/Fisheries College of Jimei University, Xiamen Fujian 361021, China;

2. Institute of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650100, China;

3. Marine Fisheries Research Institute of Ningbo, Ningbo Zhejiang 315012, China;

4. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo Zhejiang 315211, China

Abstract: In order to understand the genetic resources of cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and provide useful information for improving its breeding efficiency, AFLP (amplified fragment length polymorphism) and SSR (simple sequence repeat) markers were employed to study two cultured populations of DaiQu of this species (NBA and NBB) in Zhejiang province and farmed and wild stocks Min-Yue (GJY and FJ) in Fujian province. Two hundred and forty-four distinct fragments were amplified from the four populations in total, using five primer combinations. NBB population had the lowest proportion of polymorphic loci (54.51%), while the proportion of polymorphic loci of the other groups was about 63%. SSR analysis showed that the average allele number (Na) of the four populations ranged from 6.00 to 8.36, with an average heterozygosity (Ho) of 0.68 to 0.78. Meanwhile, the average expected heterozygosity (He) of NBA was only 0.75, and it was larger than 0.8 in the other populations. A UPGMA dendrogram was constructed by employing the AFLP and SSR data and all results showed that GJY and FJ were most closely related to each other and, therefore, clustered into one group. Meanwhile, NBA and NBB were clustered into another group. Taking into consideration the various genetic parameters of the four populations, the two Fujian populations had slightly greater genetic diversity than the two cultured populations in Ningbo. According to the minimum evolutionary tree and the factor correspondence analysis (FCA), we concluded that the genetic structure of NBA was obviously different from that of the other populations. Interestingly, we found two individuals in the wild population of Fujian province which were clustered together with their farmed counterparts.

Key words: *Larimichthys crocea*; AFLP; SSR; genetic diversity

责任编辑 胡杨

